

VĚDECKÝ ČASOPIS

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

11

ROČNÍK 10 (XXXVIII)
PRAHA,
LISTOPAD 1965
CENA 10 Kčs

ÚSTAV
VĚDECKOTECHNICKÝCH
INFORMACÍ MZLVH

Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král, (předseda), člen korespondent ČSAV akademik Ivan Brauner, doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., prof. MVDr. Tomáš Gdovin, MVDr. Martin Lis, MVDr. Andrej Mačička, MVDr. Ladislav Polák, CSc., doc. MVDr. Oldřich Svoboda, doc. MVDr. inž. Jan Vlček, pplk. MVDr. Miroslav Vojáček, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, CSc., MVDr. Ladislav Zima, MVDr. Alojz Žuffa, CSc.

Vedoucí redaktor František Němec

© Ústav vědeckotechnických informací MZLVH, Praha 1965

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací ministerstva zemědělství, lesního a vodního hospodářství. Vychází měsíčně. Redakce: Praha 2, Mánesova 75, telefon 274551-8. Celoroční předplatné Kčs 120.—

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о разрешенных заданиях по научному исследованию в области ветеринарной медицины. Издает Институт научно-технической информации Министерства сельского, лесного и водного хозяйства. Выход в свет ежемесячно. Редакция Прага 2, Манесова 75.

The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes studies, analyses and scientific treatises about the solved research tasks in the line of the veterinary medicine. Published by the Institute of Scientific and Technical Information of the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management. Issued monthly. Editorial office Prague 2, Mánesova 75.

Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben vom Institut für wissenschaftlich-technische Informationen des Ministeriums für Land-, Forst- und Wasserwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion Praha 2, Mánesova 75.

Le journal scientifique VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publie les études, analyses et traités scientifiques concernant les tâches de recherches résous dans le domaine de médecine vétérinaire. Publié par l'Institut des renseignements scientifiques et techniques du Ministère de l'agriculture, des eaux et des forêts. Paraît une fois par mois. Rédaction Prague 2, Mánesova 75.

■ Morfologické nálezy u ozářených zvířat jsou vhodným druhem doplňujícího a diagnostického vyšetření, které nás informuje o dynamice změn, síle poškození jednotlivých orgánů a o změnách obranyschopnosti takto poškozeného organismu.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Základním zdrojem informací o následcích, které vyvolává ionizující záření v jednotlivých orgánech a tkáních laboratorních zvířat je v novější době monografie Bloom a spolupracovníků (1948), kteří spolu s Lamsonem a Tullisem (1951) provádějí základní rozdělení jednotlivých orgánů a tkání podle citlivosti k ionizujícímu záření vzhledem k vznikajícím histologickým změnám. Nejvýraznější změny byly nalezeny v lymfoidní a hematopoetické tkáni, epitelu krypt tenkého střeva a na zárodečném epitelu varlat. Tyto tkáně byly v důsledku výrazných strukturálních změn označeny jako radiosenzitivní, ostatní byly považovány vzhledem k méně výrazným změnám morfologicky za více-méně radiorezistentní. K této skupině byly zařazeny zejména játra, ledviny a CNS, kde histologicky kromě projevů hemoragické diatézy a poškození cévního aparátu nepozorovali shora uvedení autoři výraznější morfologické poškození. Řada prací pak na větším počtu zvířat a v jiných experimentálních podmínkách potvrdila obzvláštní citlivost tkání označených jako radiosenzitivní, ale zároveň bylo shledáno, že všechny tkáně, orgány a jejich buněčné i subcelulární součásti reagují specificky na působení ionizujícího záření, což má i odraz v morfologickém nálezu (Scherer, Stender 1963).

Obsáhlejší zprávu o histologických nálezech u ozářených prasat rtg paprsky podává Tullis (1951). Šlo o běhouny plemene Landrace ozářené celotělově dávkou 600 r a zabíjené a pitvané v různých intervalech od 50 min. do 164 hod. po expozici.

Histologické známky poškození ionizujícím zářením byly pozorovány v hematopoetické, endoteliální a gastrointestinální tkáni, ostatní orgány nevykazovaly signifikantní změny. Další práce na prasatech, při kterých bylo prováděno histologické vyšetření je studie autorů Brauna, Staubesanda, Wolfa (1961), kteří ozářili 5.—7. týdenní selata dávkami od 500 r do 1000 r. Zvířata byla pitvána po uhynutí 8. až 35. den po expozici. Kromě typických nálezů na lymfoidní tkáni mízních uzlin, kde nepozorovali odlišnou reakci mezi lymfatickými uzlinami mezenterálními a korespondujícími v kosterní svalovině, dále na tonzylách, kostní dřeni, slezině a varlatech, upozorňují především na pro-

liferanční tendence intersticia v těchto poškozených orgánech a na vznik mikroabscesů v mízních uzlinách a játrech. Autoři poslední práce rovněž pozorovali všeobecné projevy hemoragické diatézy a poškození vaskulárního aparátu. Proliferace stromatu byla pozorována v ledvinách u déle přežívajících zvířat po dávce 1000 r ve formě červené atrofie.

METODIKA

Materiál byl získáván bezprostředně po uhynutí při pitvě případně po porazení ozářených prasat — běhounů, dávkami 450–700 r, 8.–36. den po expozici. Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin:

1. prasata poražená, u kterých nedošlo k rozvoji akutní nemoci z ozáření,
2. prasata uhynulá za příznaků rozvinuté akutní nemoci z ozáření,
3. prasata poražená před nástupem klinických příznaků akutní nemoci z ozáření,
4. prasata poražená v rozvoji akutní nemoci v ozáření.

Chování pokusných zvířat, ozařovací podmínky, klinické a patoanatomické nálezy jsou předmětem rozsáhlejší studie. Za poskytnutý materiál děkují tímto V. Kalousové a O. Pawlovi.

Pro histologické vyšetření byly odebírány mízní uzliny submandibulární, slezina, játra, případně ledvina, CNS, střevo tlusté a slepé, srdce a plíce. Vzorčky orgánů byly fixovány v Bakerově fixační tekutině, zality zkrácenou alkohol-acetonovou řadou autotechnikou do parafinu. Řezy 7 mikronů silné byly barveny přehledně hematoxylin-eosinem. Zmrazené řezy z jater byly pak barveny na neutrální tuky šarlachovou červení.

VÝSLEDKY HISTOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ

1. skupina:

prasata u nichž nedošlo k rozvoji akutní nemoci z ozáření — poražená.

Dávka 450 r 36. den:

Slezina — lymfoidní tkáň ve formě Malpighiho tělísek vykazuje zřetelnou ložiskovitou regeneraci. V sestavě lymfoidního uzlíku převažují však mladé lymfocyty s výraznou bazofilní tinkcí. Ojedinele jsou pozorovány změny na stěně cévní ve formě edému a určitého rozvolnění vazivových snopců stěny cévní.

Mízní uzlina submandibulární — v celkové struktuře lze pozorovat pokračující regeneraci lymfoidní tkáně, a to jak ložiskovitou tak difúzní. Zárodečná centra lymfatických folikulů jsou zřetelná s větším obsahem mladých lymfocytů, podíl retikulárních buněk ustupuje do pozadí. Ve dvou případech byl pozorován dosud edém perifolikulárních sinů, na krevních cévách a vazivových septech lze pozorovat dosud mírné rozvláknění vazivových snopců.

Srdce — byla zjištěna ložiskovitá degenerace některých svalových snopců se ztrátou žíhání. U těchto snopců byla výraznější afinita plazmy ke kyselým barvivům a zřetelná pyknóza jader. Na některých svalových snopcích bylo možno pozorovat homogenizaci.

- Plíce** — byla nalézána mírná hyperemie a mírný alveolární ložiskovitý emfyzem. V jednom případě zřetelně difuzní zesílení intersticia.
- Játra** — celkově zjištěna výrazná hyperemie s výraznou náplní větších i menších cév. V jednom případě zjištěn menší krevní výlev. Na jaterních buňkách zjištěny v protoplazmě změny v podobě shlukování plazmy v chomáčky s ložiskovitou vakuolizací.
- Ledvina** — v koře i ve dřeni ledvině zjišťovány drobné extravazáty, v koře zejména v okolí glomerulů.
- Mozek** — byla nacházena výrazná hyperemie cév mozkových, a to jak v hmotě nervové, tak i v plenách. Ojedinelé krevní výlevy byly zjištěny v oblasti čtverhrbolí a Varolova mostu. Na některých gangliových buňkách byly zjištěny degenerativní změny na jádrech, snížená barvitelnost až jejich úplné vymizení. Tyto změny byly zjištěny v hemisférách a v mozečku.
- Mícha** — vykazovala silné překrvení krevních cév i krevní výlevy v plenách.
- Dávka 450 r 49. den:
- Slezina** — lymfoidní tkáň vykazuje zřetelnou regeneraci. V Malpighiho tělískách převládají již lymfocyty a lymfoblasty i když zůstává podíl buněk retikulárních a histiocyty.
- Mízní uzlina submandibulární** — probíhá zřetelná regenerace lymfoidní tkáně, a to jak ložiskovitá, tak difuzní. Ve složení lymfoidních folikulů převládají lymfocyty a lymfoblasty. V perifolikulárních sinech byly nalézány často lymfocyty. Ojedinelý byl nález neutrofilních granulocytů. Na buňkách lymfoidního charakteru byla pozorována zřetelná mitotická aktivita.
- Plíce** — jediným nálezem byl ložiskovitý, mírný, alveolární emfyzém.
- Játra** — trámcovitá struktura a stavba tkáně zachována. Bylo pozorováno výrazné zmnožení interlobulárního vaziva s mírnou kulatobuněčnou infiltrací sept a vakuolizací plazmy některých okrsků jaterního parenchymu.
- Ledvina** — ojedinelé drobné krváceniny ve dřeni i v koře.
- Mozek** — vcelku pozorováno silné překrvení cév a degenerativní změny na některých gangliových buňkách různého stupně.
- Dávka 700 r 33., 36. a 37. den:
- Slezina** — lze pozorovat dosud určité prořidnutí lymfoidní tkáně s počínající ložiskovitou regenerací. V buněčném složení Malpighiho tělísek převládají dosud buňky retikulární a histiocyty, i když se objevuje výrazný podíl lymfoblastů a lymfocytů. Na stromatu lze dosud pozorovat zřejmé uvolnění vazivových snopků po předchozím edému. Obdobně na cévách je možno v některých případech pozorovat rozvláknění stěny.
- Mízní uzlina submandibulární** — dosud mírné prořidnutí lymfatické tkáně, folikuly jsou však již zřetelné s podílem lymfocytů a lymfoblastů. Obdobně jako na stromatu a cévách sleziny bylo pozorováno určité rozvláknění vazivové složky.
- Plíce** — nevykazovaly podstatných morfologických změn.

2. skupina:

prasata uhynulá za příznaků rozvinuté akutní nemoci z ozáření jednotlivě 8.—26. den.

Dávka 700 r.

Slezina — celkové výrazné prořidnutí lymfoidní tkáně. Silná hyperemie, v některých případech i rozsáhlé krevní výlevy. Malpighiho tělíska jsou silně zmenšena, obsahují málo lymfocytů, u prasat uhynulých v pozdějším období (16., 17. den a později) se objevují náznaky regenerace — mladé formy lymfocytů. V buněčné sestavě Malpighiho tělísek převládají buňky retikulární a histiocyty. V některých případech bylo pozorováno poškození vazivového stromatu i cév. U trabekul a na stěně některých cév bylo pozorováno rozvláknění, edém a úseky stěn některých cév vykazovaly homogenizaci.

Mízní uzlina submandibulární — struktura vykazuje výrazné prořidnutí lymfoidní tkáně ve většině případů až úplné vymizení folikulů. Pod kapsulou v koře i ve dřeni mízní uzliny byly pozorovány četné extravazáty různého stáří s vypadlým hemosiderinem.

Ojedinelé, dosud zachovalé lymfatické folikuly obsahovaly různé formy retikulárních buněk a ojedinelé, zachovalé, ale většinou poškozené lymfocyty. Na některých lymfocytech bylo možno přímo pozorovat rozpad jader. U zvířat uhynulých v pozdějším období (14.—17. den) byly pozorovány známky regenerace lymfoidní tkáně. Na stromatu a krevních cévách bylo možno pozorovat podobné změny jako na slezině.

Játra — ve většině případů struktura parenchymu vcelku zachována. Byla nalézána silná hyperemie, a to jak v náplni cév, tak přímo i v sinech. V některých případech byly pozorovány i krevní výlevy zejména v okolí portobiliárních prostorů. Jaterní buňky vykazovaly v plazmě často vakuolizaci (tuk se však nepodařilo prokázat) a shlukování buněčné protoplazmy v hrudky. Na některých jádrech jaterních buněk jsme mohli pozorovat degenerativní změny, a to jak pyknózu jádra, tak i jeho rozpad.

Ledvina — struktura orgánu zcela zachována. Byly pozorovány menší či větší krevní výlevy v koře i dřeni. V koře kromě toho byl zjišťován často periglomerulární edém. Asi ve čtvrtině případů u prasat uhynulých kolem 10. dne byly pozorovány degenerativní změny na epitelu vývodných kanálků. Ve třech případech byly nalézány kulato-buněčné infiltráty kolem některých glomerulů.

Plic — základní struktura orgánu většinou zachována. Ve dvou případech zjištěn ložiskovitý alveolární emfyzém a ve třetině vyšetřovaných případů výrazný edém. Pravidelným nálezem byla hyperemie s ojedinelými perivaskulárními extravazáty do plicního parenchymu.

Mozek — základní struktura tkáně zachována. Pravidelným nálezem byla výrazná hyperemie cév v plenách i v mozkové tkáni. Na cévách byly zjišťovány změny podobné jako v ostatních orgánech, a to určité rozvláknění vaziva stěny cévní s edémem, s ojedinelou homogenizací. Na gangliových buňkách byly zjišťovány degenerativní změny na jádrech, a to jak pyknóza, tak i karyolýza.

Poměrně častým nálezem byl i perivaskulární edém ve všech úsecích nervové hmoty.

Mícha — silná hyperemie a ojedinělé drobné krváceniny v šedé i bílé hmotně. Kolem cév byl pozorován výrazný edém, jakož i zduření samotné stěny cévní a odlupování endotelu. Na nervových buňkách byly pozorovány výrazné degenerativní změny jen ve dvou případech. Šlo především o pyknózu jádra a karyolýzu.

Thlusté a slepé střevo — v několika případech bylo vyšetřeno tlusté a slepé střevo v různém stadiu rozvoje difteroidněnekrotických ložisek. V menších ložiskách dochází zprvu k nekrotizaci epitelu, trombotizaci drobných subepiteliálních cév s tvorbou fibrinových trombů. Změny se rozšiřují postupně s nekrotizací do šířky okolní sliznice i do hloubky stěny střevní. Místy byla nalezena nepřilíhající hustá infiltrace neutrofilními granulocyty.

3. skupina:

prasata poražená před nástupem klinických příznaků nemoci z ozáření — 8. den.

Dávka 700 r.

Slezina — struktura orgánu zřetelná s výrazným prořídnutím a v polovině případů až s úplným vymizením lymfoidní tkáně Malpighiho tělísek. V okolí trabekul i pod kapsulou jsou též pozorovány starší krevní výlevy. Červená pulpa obsahuje však málo krve. Zároveň na trabekulách a na některých cévách lze pozorovat edém a rozvolnění vazivových snopců. V buněčné sestavě některých dosud zachovalých Malpighiho tělísek převládají buňky retikulární a histiocyty, lymfocyty byly nalézány zcela ojediněle, některé destruované.

Mízní uzlina submandibulární — vykazuje výrazné prořídnutí lymfoidní tkáně až úplné vymizení folikulů. V buněčné sestavě převládají zcela retikulární buňky a histiocyty, ojediněle lymfocyty vykazují intenzivní tinkci. Byl pozorován poměrně značný výskyt eosinofilů. Pouzdro a vazivové stroma vykazuje edém, místy rozvláknění.

Játra — acinózní struktura byla ve většině případů zachovalá. Asi v polovině preparátů bylo výrazné ložiskovité zmnožení intersticia s výraznou infiltrací eosinofilů. Ojediněle byly nalézány nahloučeniny kulatobuněčných elementů v intersticiu zejména v okolí portobiliárních prostorů. Na samotných jaterních buňkách bylo pozorováno ojediněle shlukování protoplazmy v chomáčky a ložiskovitě výrazná bazofilie jader. V jiných případech byla naopak zaznamenána špatně se barvící jádra až úplné jejich vymizení.

Ledvina — základní struktura zcela zachována; byly pozorovány krevní výlevy v okolí glomerulů a výrazná hyperemie dřeně. Krevní cévy však byly ve většině případů prázdné, s ojedinělou náplní erytrocytů. Na některých vývodných kanálcích byla pozorována špatná barvitelnost některých jader a ojediněle eosinofilně se barvící hmota v některých vývodných kanálcích v dřeni.

Dávka 700 r — prasata poražena 11. den:

Slezina — v celkové struktuře orgánu chybí téměř bílá složka, červená pulpa obsahuje rovněž málo erytrocytů, kromě krevních výlevů, kde se nalézá rovněž větší množství hemosiderinu v trabekulárních sinech. Malpighiho tělíska vykazují obdobnou buněčnou sestavu jako u předchozí skupiny s poněkud větším podílem lymfocytů, a to zejména mladých forem.

Mízní uzlina submandibulární — vykazuje dosud prořidnutí lymfoidní tkáně i když jsou pozorovány proti předchozí skupině známky regenerace. Folikuly jsou většinou zřetelné i když na lymfocyty poměrně dosud chudé. Byl pozorován rovněž perifolikulární edém. V buněčné sestavě mají značný podíl buňky retikulární a histiocyty a mladé formy lymfocytů. V koře byly zjišťovány četné starší krváceniny.

Játra — struktura acinózní zachovalá, ložiskovitě mírné zmnožení intersticia s infiltrací eosinofilů a ojedinělými nahloučeninami kulatobuněčných elementů. Shlukování plazmy v jaterních buňkách pozorováno ojediněle.

4. skupina:

prasata poražená v rozvoji akutní nemoci z ozáření 11. a 12. den.
Dávka 700 r.

Slezina — vykazuje celkové prořidnutí lymfoidní tkáně. Zachovalá Malpighiho tělíska jsou zjišťována jen ojediněle a jejich buněčná sestava odpovídá předchozí skupině. Rovněž byly zjišťovány krevní výlevy v okolí trabekul.

Mízní uzlina submandibulární — lymfatická tkáň vykazuje prořidnutí, folikuly obsahují poměrně málo lymfocytů, které vykazují poměrně výraznou bazofilii. V koře pozorujeme perifolikulární edém a krevní výlevy s vypadlým hemosiderinem.

Játra — acinózní struktura celkem zachovalá, v okolí portobiliárních prostorů ojediněle nahloučeniny kulatobuněčných elementů. Jaterní buňky vykazují ojediněle hrudkovitou protoplazmu a mírné degenerativní změny na jádrech.

DISKUSE

Nejvýraznější změny v orgánech ozářených prasat dávkou 700 r i 450 r byly histologickým vyšetřením zjišťovány v mízních uzlinách a slezině. Tato skutečnost je v plném souladu se všeobecně známými poznatky o výrazné senzitivitě lymfoidní tkáně k ionizujícímu záření i s výsledky histologického vyšetření ozářených prasat X i gama paprsky, jak o nich referovali u vepřů Tullis (1951, 1955), Braun, Staubesand, Wolf (1961) a Mehlihorn (1964). Zjistili jsme však určité odchylnosti v regenerační schopnosti lymfoidní tkáně. U prasat poražených v rozvoji akutní nemoci z ozáření nastupuje nodulární typ regenerace kolem 11. dne, zatímco u prasat poražených 8. den po ozáření stejnou dávkou byl zjišťován dosud plný rozpad folikulů vyšetřované mízní uzliny, slezinných Malpighiho tělísek a celkové difúzní prořidnutí lymfoidní tkáně. U prasat uhynulých s plně rozvinutým hemoragickým syndromem byla zjišťována regenerace bílé pulpy sleziny a folikulů lymfatických uzlin mezi 14. a 17. dnem po expozici. Rozdíl mezi výsledky popsány Tullisem

(1951), lze vysvětlit menší dávkou a jinou kvalitou použitého zdroje ionizujícího záření. De Bruyn v monografii Bloomové (1948) uvádí, že nejdříve v lymfoidní tkáni nastupuje regenerace difúzní a teprve značně později regenerace nodulární. Tento závěr se nám však na základě našeho materiálu nepodařilo potvrdit. Zdá se, že k regeneraci difúzní i nodulární dochází současně nebo jen s menším časovým odstupem.

Změny na vazivovém stromatu a cévách přetrvávaly poměrně dlouho, a to i u relativně menších dávek záření (36. den 450 r). Krevní výlevy do lymfoidní tkáně byly výrazné u mízních uzlin, řidčeji se vyskytovaly pod kapsulou sleziny, a to kolem 17. až 19. dne po expozici. V ostatních případech byla pozorována obvykle výrazná hemosideróza.

Poměrně často byla vyšetřována játra. U prasat poražených 36. den po expozici dávkou 450 r byla celková struktura orgánu zřetelná, jen na jednotlivých skupinách jaterních buněk bylo zjištěno shlukování protoplazmy v chomáčky s mírnou vakuolizací plazmy bez pozitivního zjištění tukových kapének. Stejně změny byly zjišťovány i u prasat uhynulých po ozáření dávkou 700 r v rozvoji klinických příznaků nemoci z ozáření. Kromě toho jsme pozorovali poměrně často degenerativní změny na jádře jaterní buňky, a to buď ve formě pyknózy nebo karyolýzy. Tato naše zjištění jsou v souladu s výsledky Krajevského (1957), Ivanické a Mansurové (1960) a odporuje nálezům, které u prasat učinili Lamson a Tullis (1951), kteří nenašli po ozáření výraznější změny na jaterních buňkách.

U skupiny prasat poražených 8. den po ozáření dávkou 700 r jsme ojediněle našli v okolí portobiliárních prostorů výrazné nahloučeniny kulatobuněčných elementů, které můžeme klasifikovat jako Jelínkem (1956) popsanou lymfadenopatii. Dále byla v několika případech zjištěna ložisková intersticiální hepatitida, zřejmě vyvolaná migrací larev škrkavek s hojným nálezem eosinofilních granulocytů v zesíleném intersticiálním vazivu. Nekrobiotická ložiska v játrech ani výrazné proliferativní tendence intersticia v ostatních orgánech, jak je popsali Braun a spol. (1961), nebyla pozorována.

U prasat ozářených dávkou 450 r a poražených 36. den po expozici byla zjištěna v srdeční svalovině ložiska s degenerací svalových snopců a ztrátou žíhání, jak i u ozářených psů popsal Ivanov (1962).

Ledvina vykazovala ve většině případů vždy ojedinělé i hojnější extravazáty, zejména v koře, méně ve dřeni kromě makroskopicky zjistitelných výlevů krevních v pánvičce. Výrazný periglomerulární edém byl pozorován téměř u všech uhynulých prasat ozářených dávkou 700 r a uhynulých v rozvoji hemoragického syndromu. Degenerativní změny na epitelu vývodných kanálků, jak se o nich zmiňovali Tiktinskij, Tovstoles (1961) a Nüssel, Schuck (1961), byly zjištěny u prasat ozářených dávkou 700 r a uhynulých kolem 10. dne po ozáření.

Hodnotíme-li změny v CNS z hlediska ostatních změn ozářeného orgánu, nacházeli jsme četné extravazáty v různých úsecích šedé i bílé hmoty, výrazné změny na stěně cévní včetně perivaskulárního edému a degenerativní změny různého stupně na gangliových buňkách bez nápadnější lokalizace, které jsou v souladu s nálezy Kurkovského (1960).

Zvláštní pozornosti zaslouží histopatologické nálezy na sliznici a ve stěně slepého a tlustého střeva, které mohou makroskopicky imitovat klasický obraz chronického průběhu moru vepřů nebo chronické salmonelózy, jak ji popsal

S á l y i (1963). Bakteriologickým vyšetřením nebyl potvrzen pozitivní nález salmonel. Znamky zánětu a okolní tkáňové reakce byly velmi slabé, reprezentovány jen slabou infiltrací neutrofilních granulocytů v submukóze.

S O U H R N

Byly sledovány histologické změny u prasat jednorázově celotělově ozářených gama paprsky Co^{60} dávkami 450 a 700 r.

Nálezy byly sledovány ve skupinách:

1. prasata, u nichž nedošlo k rozvoji akutní nemoci z ozáření (poražená),
2. prasata uhynulá za příznaků rozvinuté akutní nemoci z ozáření,
3. prasata poražená před nástupem klinických příznaků akutní nemoci z ozáření,
4. prasata poražená v rozvoji akutní nemoci z ozáření.

Nejvýraznější změny byly zjištěny v souhlase s údaji jiných autorů v lymfatických uzlinách a ve slezině. U prasat poražených v rozvoji klinických příznaků akutní nemoci z ozáření (4. skupina) nastupují známky nodulární regenerace jedenáctý den po expozici, zatímco u prasat poražených osmý den a ozářených stejnou dávkou 700 r známky regenerace zcela chybí. U prasat uhynulých v rozvoji nemoci z ozáření po dávce 700 r byla pozorována regenerace lymfoidní tkáně mezi 14. a 17. dnem.

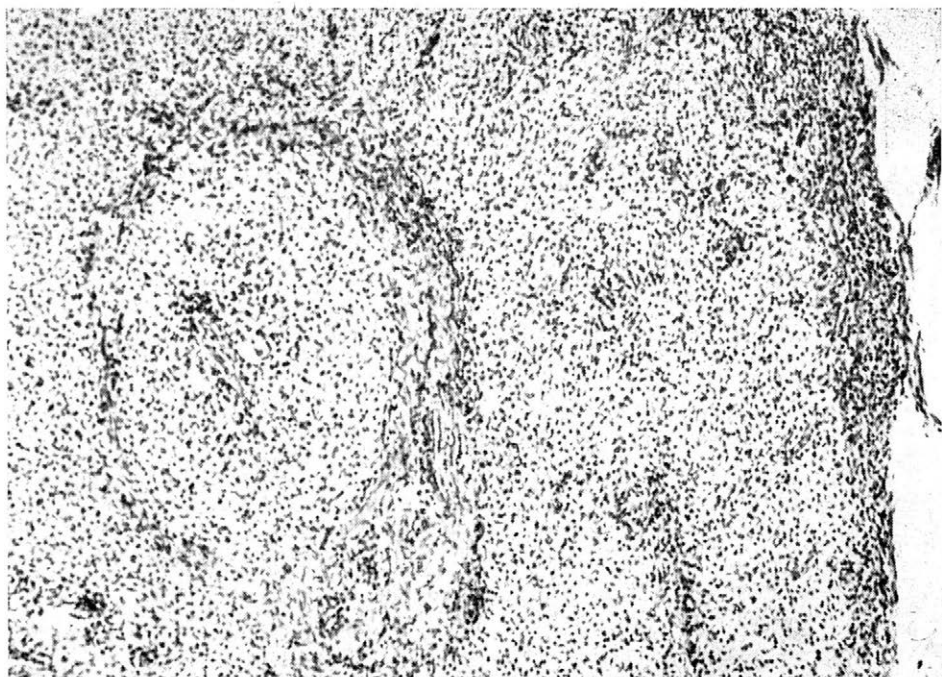
Na jednotlivých skupinách jaterních buněk, jater prasat ozářených dávkou 700 r, bylo pozorováno shlukování protoplazmy v chomáčky, vakuolizace a degenerativní změny na játrech, a to buď ve formě pyknózy nebo karyolýzy. Tukové kapénky v místech vakuolizace protoplazmy zjištěny nebyly.

V různých orgánech byly pozorovány četné extravazáty, které nebylo možno pozorovat makroskopicky (ledvina, CNS). Poměrně časté byly difteroidně nekrotické změny na sliznici tlustého a slepého střeva bez výraznější zánětlivé infiltrace v okolí ložiska.

Došlo dne 17. 5. 1965

L i t e r a t u r a

1. Braun, W., Staubesand, J., Wolf, V.: Strahlenschäden am Schwein und deren Beeinflussung durch Amino-äthyl-isothiuronium-chlorid-hydrochlorid. „Arzneimittel-Forschung“ (Drug Res.), 11, 1961 : 630 : 642. — 2. De Bruyn, P. P. H.: Lymph Node and Intestinal Lymphatic Tissue. In: Bloom, W.: Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources. New York-Toronto-London, McGraw-Hill Book Company, Inc. 1948, s. 348-445. — 3. Davis, J. M. G.: Effect of roentgen rays on the ultrastructure of degeneration rat liver cells. Acta Radiol., 58, 1962 : 129-140. — 4. Davis, M. L., Cosgrove, G. E., Gude, W. D.: Liver changes in sublethally irradiated mice undergoing the foreign spleen reaction. Radiat. Res., 17, 1962 : 133-139. — 5. Ivanov, A. E.: Izmenenija serdca i osudov. In: Krajevskij, N. A.: Patologičeskaja anatomija radiacionnych poraženij. Mnogotomnoje rukovodstvo po patologičeskoj anatomiji VIII, Moskva, Medgiz 1962, s. 135-148. — 6. Ivanickaja, A. F., Mansurova, V. U.: Izučenie dejstvija rtg oblučeniya na pečeni beloj myši. Trudy inst. morfologii životnyh im. Severcova (Izd. AN SSSR) 24, 1960 : 105-114. — 7. Jelínek, V.: Lymphadenopathia nodularis multiplex hepatitis sum. Veterinární medicína. 29, 1956 : 1-9. — 8. Krajevskij, N. A.: Izmenenije organov piščevarenija. In: Krajevskij, N. A.: Očerki patologičeskoj anatomiji lučevoj bolezni. Moskva, Medgiz 1957, s. 68-87. — 9. Kurkovskij, V. P.: O morfoložičeskich izmenenijach centralnoj i periferičeskoj nervnoj sistemy sobak pri ostroj lučevoj bolezni. Archiv patologii (Moskva), 22, 1960 : 15-21. — 10. Lamson, G. B., Tullis, J. L.: The progression of morphologic lesions in swiss mice exposed to



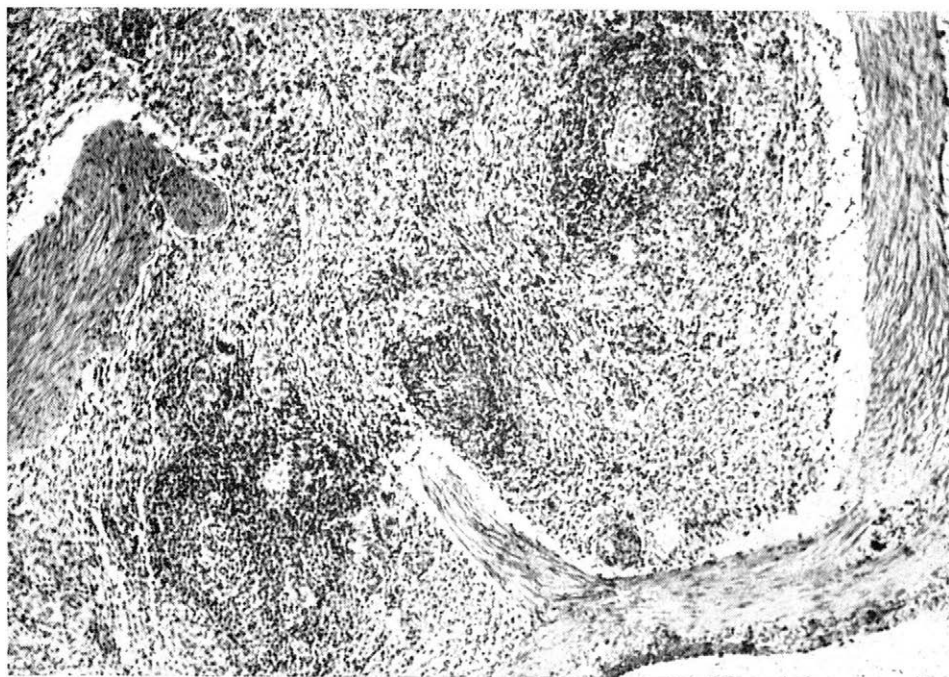
1. Mízní uzlina submandibulární — prořídnutí lymfoidní tkáně (700 r, osmý den, 3. skupina) Obj. 6×, ok. K 4:1



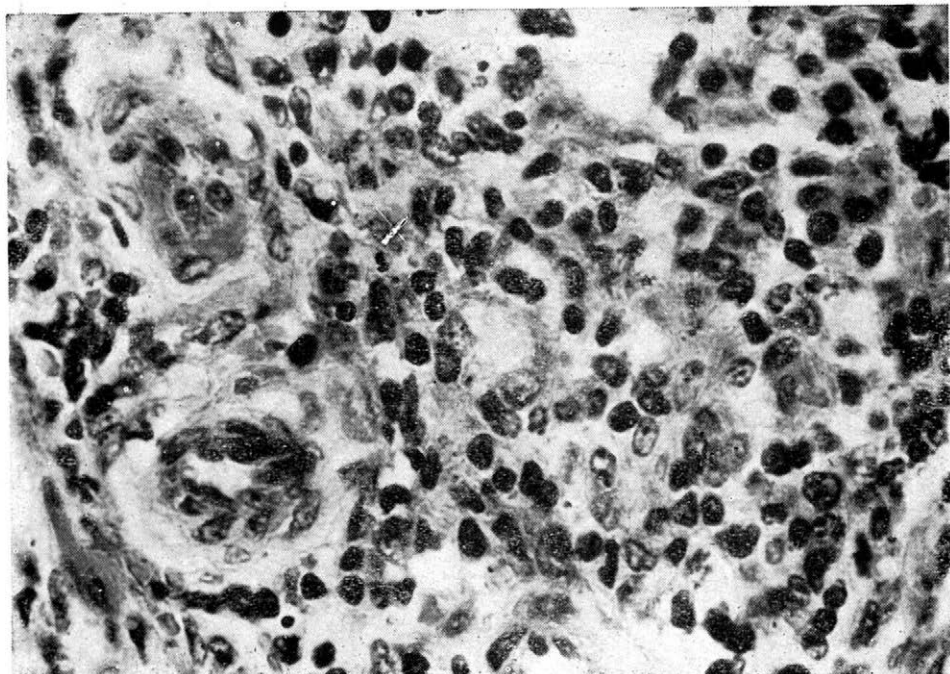
2. Mízní uzlina submandibulární, počínající regenerace lymfoidní tkáně (700 r, 11. den, 3. skupina) Obj. 6×, ok. K 4:1



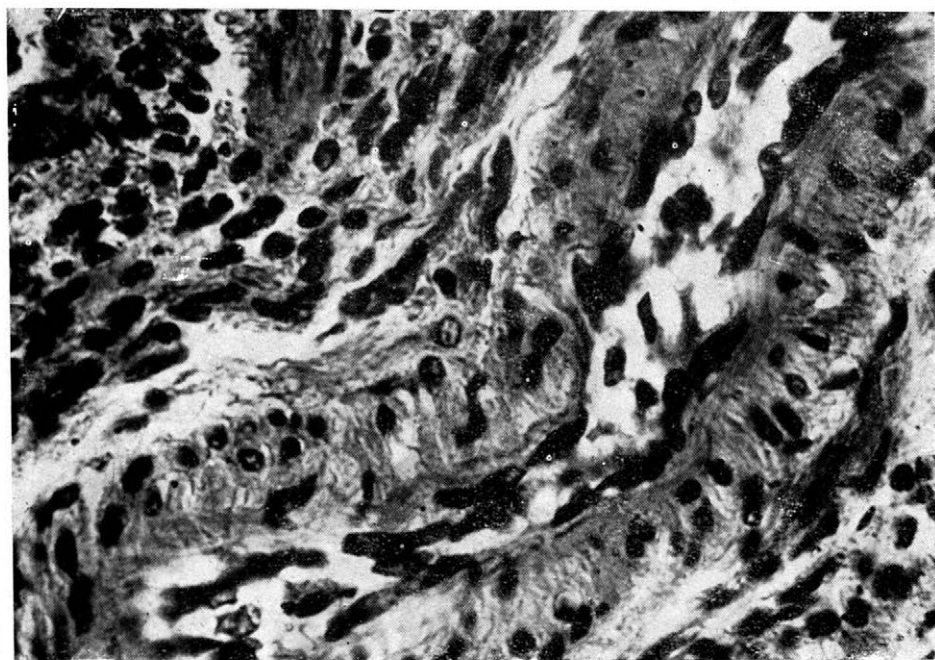
3. Slezina — úplné vymizení lymfocytů (700 r, 8. den, 3. skupina) Obj. 6X, ok. K 4:1



4. Slezina — regenerace lymfoidní tkáně v Malpighiho tělískách (450 r, 36. den, 1. skupina) Obj. 6X, ok. K 4:1



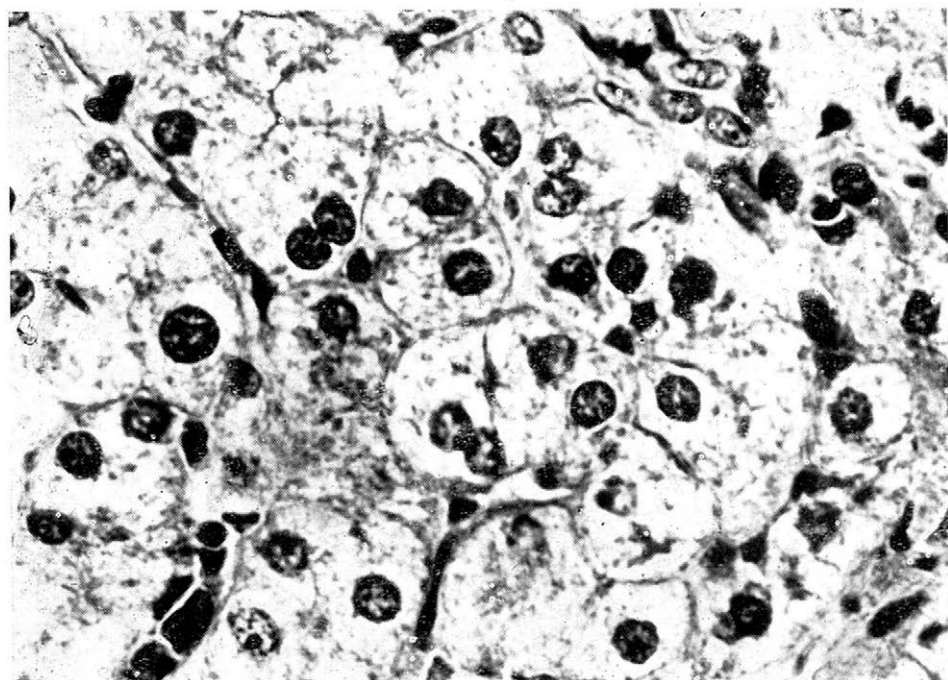
5. Slezina — vymizení lymfocytů z Malpighiho tělísek (700 r, 8. den, 3. skupina)
Obj. 45X, ok. K 4:1



6. Slezina — rozvláknění stěny cévní (700 r, 7. den, 2. skupina) Obj. 45X, ok. K 4:1



7. Myokard — degenerace jednotlivých trámčů srdeční svaloviny (450 r, 36. den, 1. skupina) Obj. 6X, ok. K 4:1



8. Játra — vakuolizace protoplazmy jaterních buněk (700 r, 3. den, 3. skupina) Obj. 45X, ok. K 4:1

625 r, 2000 KVP total body X-radiation. Military Surgeon, 109, 1951:281-293. — 11. Ludin, M.: Leberveränderungen nach Röntgenbestrahlung. Strahlentherapie, 19, 1925:138-141. — 12. Mehlhorn, G.: Spezielle Gewebe- und Organreaktionen durch die ionisierende Strahlung. In: Mehlhorn, G.: Grundlagen der Nuklearmedizin für Tierärzte. Jena, G. Fischer 1964, s. 69-87. — 13. Murray, R. G.: The Spleen. In: Bloom, W.: Histopathology of Irradiation from External and Internal Sources. New York-Toronto-London, McGraw-Hill Book Company. Inc. 1948, s. 243-347. — 14. Nüssel, M., Schuck, J.: Über Nierenveränderungen bei ganzkörperbestrahlten Schweinen. Strahlentherapie, 116, 1961:502-522. — 15. Sályi, G.: Patologicko-anatomický obraz chronické salmonelózy u ošípaných. Veterinární medicína, 8, 1963:397-400. — 16. Scherer, E., Stender, H. S.: Strahlenpathologie der Zelle. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1963, 360 s. — 17. Sokolova, N. V., Goršenina, T. I.: Morfologičeskaja charakteristika pečeni v zavisimosti ot jejo funkcionalnogo sostojanija v moment oblučenija. Archiv patologii, 24, 1962:50-55. — 18. Smith, H. A., Jones, T. C.: Pathologic effect of ionizing radiations. In: Smith, H. A., Jones, T. C.: Veterinary pathology. London, Kimpton 1957, s. 520-533. — 19. Tiktinskij, O. L., Tovstoles, K. M.: Patologičeskije izmeněnija v počkach pri vozdejstviji pronikajušej radijacii. Urologija 26, 1961:70-73. — 20. Tullis, J. L., Warren, S.: Gross Autopsy Observations in the Animals Exposed at Bikini. Preliminary Report. J. Am. Med. Assn., 134, 1947:1155-1159. — 21. Tullis, J. S.: The sequence of pathologic changes in swine exposed to the LD 100/30 of total body supervoltage X-radiation. Milit. Surgeon, 109, 1951:271-278. — 22. Tullis, J., Lamson, B., Madden, S.: Pathology of swine to totalbody gamma radiation exposed an atomic bomb surge. Amer. J. Path., 31, 1955:41-61. — 23. Zareckaja, J. M.: Morfologičeskije izmeněnija v limfoidnyh organach posle vozdejstvija ionizirujuščego izlučénija. In: Zareckaja, J. M.: Limfoidnyje organy v lučevoj patologii. Moskva, Medgiz 1961, s. 7-17.

Гистопатологические изменения у свиней, облученных по всему телу гамма-лучами

Изучались гистологические изменения у свиней, один раз облученных по всему телу гамма-лучами Co^{60} дозами 450 и 700 г.

Диагнозы изучались по группам:

1. свиней, у которых не развивалась острая лучевая болезнь (забитые),
2. свиней, погибших с симптомами развившегося острого заболевания в результате облучения,
3. свиней, забитых до появления клинических симптомов острого заболевания в результате облучения,
4. свиней, забитых в стадии развития острого заболевания в результате облучения.

Самые сильные изменения были установлены в соответствии с данными других авторов в лимфатических ганглиях и в селезенке. У свиней, забитых в стадии развития клинических симптомов острого заболевания в результате облучения (4 группа) первые признаки нодулярной регенерации появились на одиннадцатый день после экспозиции, в то время как у свиней, забитых на восьмой день и облученных такой же дозой 700 г, признаки регенерации полностью отсутствуют. У свиней, погибших в период развития болезни, как последствия облучения дозой 700 г, наблюдалась регенерация лимфоидной ткани между 14 и 17 днем.

На отдельных группах печеночных клеток, печени свиней, облученных дозой 700 г, наблюдалось скопление протоплазмы в комках, вакуолизация и дегенеративные изменения печени, в частности в форме пикнозы или кариозы. Жировые капли и в местах вакуолизации протоплазмы обнаружены не были.

В разных органах наблюдались многочисленные экстравазаты, наблюдать которые микроскопически не было возможности (почка, ЦНС). Сравнительно частыми были дифтерийные некротические изменения на слизистой оболочке толстой и слепой кишки без явной воспалительной инфильтрации вокруг очага.

Histopathological Changes in Pigs Whole-Body Irradiated with Gamma-Rays

Histological changes in pigs whole-body irradiated with a single dose of Gamma-rays Co^{60} at doses of 450 and 700 r were traced.

The findings were traced in groups as follows:

1. Pigs that did not show any development of acute irradiation-sickness (slaughtered),
2. Pigs decayed under symptoms of a developed acute irradiation-sickness,
3. Pigs slaughtered before the arising of clinical symptoms of acute irradiation-sickness,
4. Pigs slaughtered during development of acute irradiation-sickness.

Most expressive changes were ascertained, in accordance with other authors, in lymphatic nodes and spleen. In pigs slaughtered during the development of clinical symptoms of acute irradiation-sickness (4th group) signs of nodular regeneration arose on the 11th day after exposure whereas in pigs slaughtered on the 8th day and irradiated with the same dose of 700 r the signs of regeneration did not appear at all. In pigs decayed during the development of the irradiation-sickness after the dose 700 r a lymphoid-tissue regeneration was observed between the 14th and 17th day.

Agglomeration of protoplasm into tufts was observed in single groups of liver cells of pigs irradiated with the dose of 700 r as well as vacuolization and degenerative changes in liver either in form of pyknosis or karyolysis. Fat droplets in places of protoplasm — vacuolization were not ascertained.

In various organs numerous extravasates were observed not visible macroscopically (kidney, central nervous system). Diptheroidally necrotic changes in the mucous membrane of large intestine and caecum were found comparatively often without any more expressive inflammatory infiltration in the focus-surroundings.

Histopathologische Veränderungen bei den auf dem ganzen Körper mit Gammastrahlen behandelten Schweinen

Man verfolgte die histologischen Veränderungen bei Schweinen, die einer Körperbestrahlung mit Gammastrahlen Co^{60} in Dosen von 450 und 700 r ausgesetzt worden waren. Die Befunde wurden in folgenden Gruppen verfolgt:

1. Schweine, bei denen sich die Bestrahlungsschäden nicht auswirkten (geschlachtete Tiere),
2. Schweine, die unter Merkmalen der entfalteten akuten Strahlungswirkungen abstarben,
3. Schweine, die vor dem Eintritt klinischer Symptome der akuten Strahlungswirkungen geschlachtet wurden,
4. Schweine, die während der Entfaltung der akuten Strahlungswirkungen geschlachtet wurden.

Die bedeutendsten Veränderungen wurden entsprechend den Angaben anderer Autoren in den Lymphknoten und in der Milz festgestellt. Bei Schweinen, die während der Entfaltung der klinischen Symptome der akuten Strahlungskrankheit (4. Gruppe) geschlachtet wurden, treten Merkmale einer nodulären Regeneration am elften Tag nach der Exposition ein, wogegen bei Schweinen die am achten Tag geschlachtet und mit derselben Dosis von 700 r bestrahlt wurden, die Merkmale der Regeneration vollkommen fehlen. Bei Schweinen, die während der Entfaltung der Strahlungswirkungen nach einer Dosis von 700 r abstarben, beobachtete man die Regeneration des Lymphgewebes zwischen dem 14. und 17. Tag.

An den einzelnen Leberzellengruppen von Schweinen, die mit einer Dosis von 700 r bestrahlt wurden, beobachtete man eine Anhäufung des Protoplasmas in kleine Klumpen, eine Vakuolisierung und degenerative Veränderungen der Leber, u. zw. in Form von Pyknose oder Karyolyse. Fetttropfen an Stellen der Vakuolisierung des Protoplasmas wurden nicht ermittelt.

In verschiedenen Organen beobachtete man zahlreiche Extravasaten, die makroskopisch nicht zu erkennen waren (Niere, zentrales Nervensystem). Die diptheroid-nekrotischen Veränderungen der Schleimhaut des Dick- und Blinddarms ohne ausgeprägte Entzündungs-Infiltration in der Umgebung des Herdes kamen verhältnismäßig oft vor.

Pavel Otoupal, prom. vet. lékař

Veterinární výzkumné středisko,
Praha - Motol

■ Postradiační změny počtu jednotlivých druhů buněk periferní krve byly sledovány řadou autorů, a to jak zahraničních, tak i našich. Vzhledem ke značnému množství jednotlivých dílčích studií je možno uvést pouze souborná díla (Jacobson 1954; Rybak 1958; Mehlhorn 1964; Vokken 1964; Dienstbier, Arient, Kofránek 1957; Kolektiv autorů 1965).

Změny v periferním krevním obraze jsou doposud uznávány za jeden z nejprůkaznějších ukazatelů postradiačního poškození, podle kterého lze do jisté míry usuzovat na závažnost poškození a vyslovit i případnou prognózu onemocnění.

Charakter změn v počtu jednotlivých buněčných krevních elementů u všech savců je stejný a odchylky jsou jen v rychlosti nástupu a průběhu. Změny v periferním krevním obraze možno rozdělit v zásadě na tři na sebe navazující fáze.

A. *Nespecifická fáze*, charakterizovaná dočasným vzestupem počtu bílých krvinek, podmíněným neutrofilii za současné redukce počtu lymfocytů jako specifické postiradiační léze. Počet červených krvinek nevykazuje podstatné změny. Tato první fáze trvá různě dlouhou dobu, 8 až 24 hodin, a to čím vyšší je dávka celotělového ozáření, tím rychleji přechází v další fázi.

B. *Období akutních postradiačních změn*, trvající několik dní až týdnů, charakterizované postupně se rozvíjejícím poklesem všech buněčných součástí.

C. *Období reparace*, které plynule navazuje na předchozí fázi, kdy, nebyl-li průběh smrtelný, dochází během několika týdnů či měsíců postupně k normalizaci počtu všech druhů krvinek. Zde byla v pozdějších údobích pozorována některá zhoubná onemocnění krvetvorby (leukémie, zhoubné anémie, polycytémie atd.).

Souběžně s početní redukcí dochází i k funkčnímu poškození bílých krvinek. Snižuje se jejich pohybová schopnost. Bílé krvinky nejsou schopny fagocytózou zneškodňovat mikroorganismy vniklé do krve, jak je tomu u zdravého organismu. Dalším výrazem funkčního poškození je změna osmotické odolnosti leukocytů.

METODIKA

Prasata a kozy byly rozděleny do jednotlivých pokusných skupin, jak je uvedeno v tabulce I.

Prasata		Kozy	
dávka celotělového ozáření	počet zvířat ve skupině	dávka celotělového ozáření	počet zvířat ve skupině
450 r	6	500 r	6
700 r	6	700 r	6
kontroly	8	kontroly	8

Metodika ozařování, druh pokusných zvířat, krmení a ošetřování je popsáno ve sdělení O. Pawla a jeho spolupracovníků (předcházející článek), protože hematologické sledování bylo prováděno v rámci jím uvedené studie.

HEMATOLOGICKÁ METODIKA

Odběr krve byl prováděn suchou čistou jehlou z *vena jugularis* u koz a prasat. Krev byla odebírána:

1. do penicilinové lahvičky, ve které byl odparek 0,25 ml roztoku šfavelanu draselného 0,8 g a 1,2 g šfavelanu amonného ve 100 ml destilované vody.

Z této nesrážlivé žilné krve byl určován počet červených krvinek, bílých krvinek, hematokrit, počet retikulocytů;

2. nativní krev, z které byly zhotoveny krevní nátěry.

Počet červených krvinek byl zjišťován po zředění nesrážlivé žilné krve Haymovým roztokem v baničkách na červené krvinky. Krvinky byly počítány obvyklým způsobem v Bürkerově komůrce. Hematokrit byl určován metodou podle Wintroba. Počet bílých krvinek byl zjišťován po zředění nesrážlivé krve Türkovým roztokem. Počítání bylo prováděno v Bürkerově komůrce obvyklým způsobem. Počet retikulocytů byl zjišťován tak, že krycí sklíčko s kapkou krve bylo přiloženo na podložní sklíčko se zaschlým 1% roztěrem roztoku brilant-kresylové modře v alkoholu. Vyhodnocen byl počet retikulocytů připadající na 1000 červených krvinek.

Diferenciální rozpočet bílých krvinek byl prováděn z nátěrů zhotovených z nativní krve. Nátěry byly barveny May-Grünwald-Giemsou. Hodnoceno bylo 200 buněk ve stadiu leukopénie (pod 2000 bílých krvinek) v 1 ccm krve (100 buněk). U každého zvířete byly provedeny 3 odběry krve před ozáření, zjištěné průměrné hodnoty byly pro další vyhodnocování brány jako 100 %. Výsledky jsou zpracovány graficky.

VÝSLEDKY

PRASATA

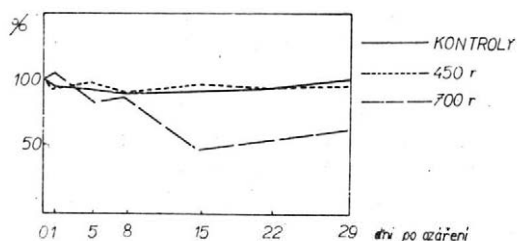
Počet červených krvinek. (graf 1.) Z grafu je zřejmé, že k poklesu počtu červených krvinek došlo pouze u skupiny prasat ozářených celotělově dávkou 700 r, a to za 15 dnů ode dne ozáření. Počet červených krvinek u prasat ozářených celotělově dávkou 450 r nebyly v průběhu celého sledování nalezeny žádné odchylky od počtu červených krvinek skupiny kontrolní.

Hematokrit (graf 2). Změny v hodnotách hematokritu probíhaly u skupin prasat ozářených obdobně jako změny v počtu červených krvinek.

Počet retikulocytů (graf 3). Počet retikulocytů nápadně stoupl u skupiny kontrolní, což lze přičíst stimulaci hematopoézy jako následků prováděných odběrů. Přesto, že u skupin ozářených byly odběry prováděny stejnou technikou a množstvím odebrané krve bylo stejné s množstvím odebrané krve u skupiny kontrolní, nebyla tato stimulace pozorována u obou ozářených skupin, naopak byl zde zjištěn nápadný pokles počtu retikulocytů, který byl úměrný dávce celotělového ozáření.

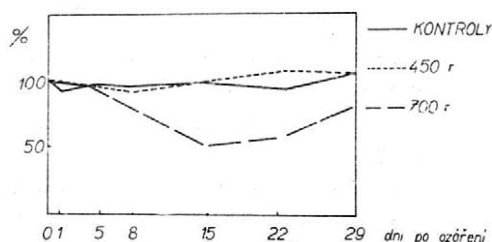
Počet bílých krvinek (graf 4). U kontrolní skupiny se počet bílých krvinek v průběhu celého sledování neustále pohyboval nedaleko výchozích hodnot. Proti tomu u ozářených skupin prasat došlo k známé postiradiační leukopénii, jejíž hloubka byla závislá na dávce celotělového ozáření.

ERYTROCITY - PRASATA



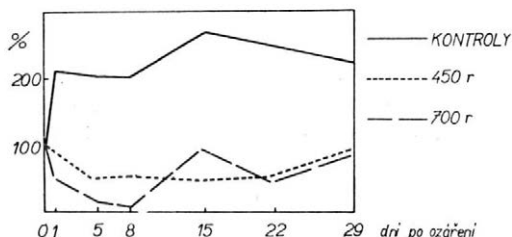
Graf 1.

HEMATOKRIT - PRASATA



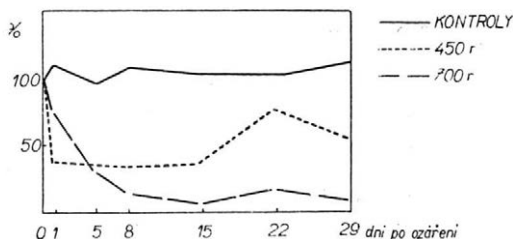
Graf 2.

RETIKULOCYTY - PRASATA



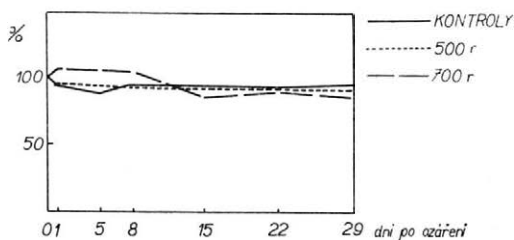
Graf 3.

LEUKOCYTY - PRASATA



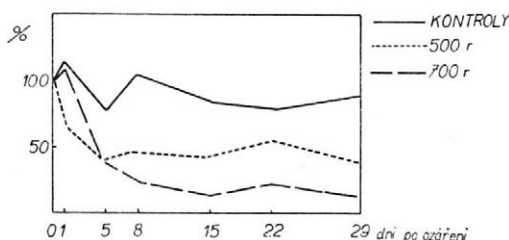
Graf 4.

ERYTROCITY - KOZY

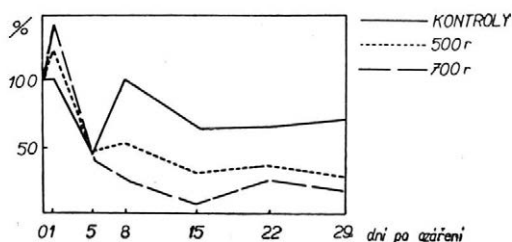


Graf 5.

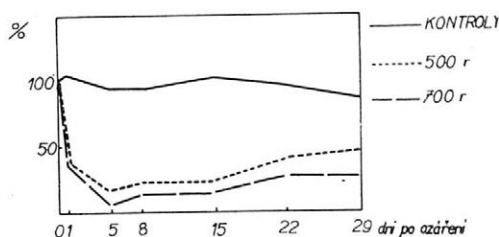
LEUKOCYTY - KOZY



Graf 6.



Graf 7.



Graf 8.

KOZY

Počet červených krvinek (graf 5). Vzhledem k počtu červených krvinek u skupiny kontrolní nebyla zjištěna jak u skupiny koz ozářených celotělově dávkou 500 r, tak 700 r postiradiační anémizace, což potvrzují i hodnoty hematokritu.

Počet bílých krvinek (graf 6). U obou skupin ozářených došlo za 24 hodiny k vzestupu počtu bílých krvinek, který byl v pozdějším údobí vystřídán typickou leukopénií charakteristickou pro akutní nemoc z ozáření. Počáteční vzestup bílých krvinek byl způsoben především neutrofilii, což dokumentuje graf 7. Lymfocyty (graf 8) se i u tohoto druhu zvířat projevily jako vysoce radiosenzitivní a reagovaly u obou skupin ozářených zvířat značným poklesem, jehož hloubka byla úměrná dávce celotělového ozáření. V pozdějších údobích až do konce sledování byla neustále zjišťována lymfopénie s maximem pátého dne.

DISKUSE

Námi zjištěné výsledky v podstatě odpovídají zkušenostem zjištěným u těchto druhů zvířat jinými autory (Rybak 1958; Mehlhorn 1964; Vokken 1964; Cronkite 1950; Hayashi, Miyao 1961; Hayashi, Miyac 1963). Při porovnání s výsledky dosaženými u jiných druhů pokusných zvířat (myši, krys, králíků, psů, opic, ovčí) (kolektiv autorů 1965), je opět potvrzeno Cronkitovo tvrzení (Dienstbier, Arient, Kofránek 1957), že charakter dynamiky změn počtu buněk periferní krve je u všech savců stejný a odchylky jsou jen v rychlosti nástupu a průběhu. Toto nutno uvážit i při hodnocení delšího trvání nespecifické neutrofilie v počátečním údobí akutní nemoci z ozáření u koz, které bylo v našich pokusech pozorováno.

SOUHRN

Byla sledována dynamika postiradiačních změn počtu jednotlivých buněk periferní krve u koz po ozáření celotělovou dávkou 500 r a 700 r a u prasat po ozáření celotělovou dávkou 450 a 700 r. Byla zjištěna typická postiradiační leukopénie, lymfopénie, jejíž hloubka a trvání je závislé na dávce celotělového ozáření. U prasat byl zjištěn výrazný pokles retikulocytů. Dosažené výsledky jsou ve shodě s literárními údaji.

Došlo dne 3. 5. 1965

Literatura

1. Cronkite, E. P.: The hemorrhagic syndrome of acute ionizing radiation illness produced in goats and swine by exposure to the atomic bomb at Bikini. 1964. - „Blood“ 5, 1960, 32-45. — 2. Dienstbier, Z., Arient, M., Kofránek, V.: Akutní nemoc z ozáření. - Praha, Stát. zdrav. nakl. 1957. — 3. Hayashi, M., Miyao, N.: Studies on the effect of ^{60}Co gamma irradiation on the goat. I. - „Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.“ 1, 1961:215-224. — 4. Hayashi, M., Miyao, N.: Studies on the effect of ^{60}Co gamma irradiation on the goat. II. - „Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.“ 3, 1963:156-165. — 5. Kolektiv autorů: Experimentální postiradiační syndrom. - Praha, Stát. zdrav. nakl. 1965. — 6. Mehlhorn, G.: Grundlagen der Nuklearmedizin für Tierärzte. - Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1964. — 7. Rybak, P. Ja.: Osnovy radiacionnoj patologii u živoťnych. - Gos. Izdat. Selskochoz. Lit. Moskva 1959. — 8. Vokken T. T.: Veterinarnaja radiologija. - KOLOS, Moskva -Leningrad 1964.

Динамика изменения числа клеток периферической крови у свиней и коз, облученных ^{60}Co

Была изучена динамика послерадиационных изменений числа отдельных клеток периферической крови у коз, облученных общими дозами 500 р и 700 р, и свиней, облученных общими дозами 450 р и 700 р. Была установлена типическая послерадиационная лейкопения, лимфопения, глубина и продолжительность которых зависит от дозы облучения всего тела. У свиней было установлено резкое понижение ретикулоцитов. Достигнутые результаты соответствуют литературным данным.

Dynamics of the Number-Changes of Cells in Peripheral Blood in Pigs and Goats Whole-Body Irradiated with ^{60}Co

The dynamics of the postirradiation-changes in numbers of single cells of peripheral blood was followed in goats after their whole-body irradiation with a dose of 500 r and 700 r and in pigs after the whole-body irradiation with 450 and 700 r. A typical postirradiation leucopenia, lymphopenia was found the intensity and duration of which depended on the dose of the whole-body irradiation. An expressed decrease in reticulocytes number was found in pigs. The achieved results coincide with literary data.

Die Dynamik der Zellzahlen im peripheren Blut mit ^{50}Co ganzkörperbestrahlter Schweine und Ziegen

Wir verfolgten die Dynamik der nach Bestrahlung auftretenden Änderungen in der Zahl der Zellen im peripheren Blut bei Ziegen nach Ganzkörperbestrahlung mit 500 und 700 r und bei Schweinen nach Ganzkörperbestrahlung mit 450 und

700 r. Es wurde die typische auf die Bestrahlung folgende Leukopenie und Lymphopenie festgestellt, deren Ausmaß und Dauer von der Dosis der Ganzkörperbestrahlung abhängt. Bei Schweinen wurde ein signifikanter Abfall an Retikulozyten festgestellt. Die gewonnenen Ergebnisse sind im Einklang mit den Literaturangaben.

MVDr. Jan Pospíšil CSc.

Biofyzikální ústav FVL KU,
Praha 2, Salmovská 3

MVDr. Milan Beran

Veterinární výzkumné středisko,
Praha - Motol

■ Pozornost při sledování účinku ionizujícího záření na biologické objekty se v posledních letech právem přesunuje z oblasti laboratorních zvířat přímo na zvířata hospodářsky významná. Veterinární pracoviště v Kanadě např. věnovala velkou pozornost v uplynulých 10 letech podrobnému studiu symptomatologie, mortality, patologické morfologie nemoci z ozáření u hospodářských zvířat a studiím ve smyslu zkracování života a škodlivosti ionizujícího záření u zvířat důležitých pro zemědělskou výrobu i zdravotně veterinární službu (Brown, 1963). Podobně tomu je i v jiných státech, kde veterinární služba dosáhla jisté odborné výše.

Ve smyslu těchto údajů jsou v určitém převážně praktickém směru přínosem i výsledky, které jsou předloženy v tomto sdělení. I když v případě kura domácího jsou jisté nejasnosti při stanovení účinnosti dávky ionizujícího záření ve smyslu klinických příznaků a mortality (Procházka, Hampl, 1965), není bez významu nezávislé a objektivní zhodnocení vztahu stoupajících dávek ionizujícího záření ke změnám bílého krevního obrazu. Výsledky tohoto zhodnocení jsou předloženy v následující práci.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Bílá část krevního obrazu drůbeže je výrazně lymfocytárního charakteru a průběh křivky počtu bílých krvinek je zřejmě určován především hladinou lymfocytů již od nejranějších období (Procházka, 1964). Lymfocyty patří k té složce interiéru organismu, která je nejcitlivější vůči ionizujícímu záření. Sledování celkového počtu leukocytů u slepic mohlo být tedy nejrychlejším a zřejmě citlivým ukazatelem účinnosti dávky paprsků X.

V literatuře dosud uveřejněné údaje o účinku ionizujícího záření na drůbež byly prováděny většinou na mladých kuřatech. Při té příležitosti nelze pominout údaje Lindopové (1962), která na myších dokázala, že u nedospělého zvířete může dojít k velmi rychlým změnám v sensitivitě, zatímco dospělá zvířata vykazují téměř konstantní citlivost k ionizujícímu záření. Zdá se proto v tomto smyslu správným experiment hlavně na dospělých jedincích. Murray aj. (1956) zjistili u kuřat 3–5týdenních při dávce LD₅₀ (400–800 r), že počet bílých krvinek 1–2 hod. po ozáření prudce klesá, po 10 hod. náhle stoupá (až dvojnásobně) a po 24 hod. je již opět pod normálem výchozí hodnoty. Lucas (1954) konstatuje, že u kuřat došlo po ozáření k jednorázovému poklesu hladiny bílých krvinek s restitucí počínaje 15. dnem.

V pracích skupiny domácích autorů, jejichž hlavním zájmem bylo sledování vlivu hemoplastik a oxytetracyklinu na postiradiační změny v krvi mladých

*) Ve zkráceném znění předneseno na Biofyzikální konferenci 4.–7. 5. 1965 v Brně.

Expozice v r	Počet							
	před ozářením		1. den		3. den		5. den	
	Ø	±	Ø	±	Ø	±	Ø	±
600 K	26.725	2990	13.695 23.960	5.138 3.780	10.225 23.470	5518 2325	7.805 24.620	2783 1711
800 K	26.185	1784	9.614 28.060	2.831 1.834	5.187 25.230	1914 790	—	—
1000 K	25.280	737,6	10.728 27.450	5.716 1.705	2.612 25.960	817 770	2.675 26.180	591 1464
1200 K	24.545	795,1	14,538 23.960	4,739 691,3	3,333 23.600	1.108 917	2.431 25.060	636 1104
1400 K	26.100	1240	17.050 28.750	5.643 2.391	3.481 26.710	971 4115	1.712 27.580	347 4598
1600 K	27.535	4296	15.337 23.990	6.358 5.696	—	—	1.420 23.360	152 6019
1800 K	27.300	1193	23.550 19.490	14.280 4.170	3.030 25.260	471 1523	1.810 23.940	562 1145
2000 K	24.411	1870	—	—	2.160 26.380	1115 900	1.550 23.790	448 2110

kuřat, se objevuje mimo dosud popsany pokles leukocytů v prvním týdnu ještě druhý pokles v celkovém počtu bílých krvinek. Surynek aj. (1960) tento pokles popsali po jednorázové dávce 500 r ve 20. dnu, Dressler aj. (1960, 1962) po celkové dávce 460 r (přiliv 14 r/hod.) ve 30. dnu; Mach aj. (1962) tento zjev uvádějí 25. dnem po denním ozařování malými dávkami (1 r).

METODIKA

K vlastnímu pozorování bylo vybráno 80 kusů dospělých kohoutů a slepic plemene New Hampshire, stáří 8–12 měsíců. Ptáci byli rozděleni do skupin po 10 kusech při stejném zastoupení pohlaví a jejich ozařování prováděno rtg-přístrojem při 175 kV, 15 mA, filtraci 1,0 Al a 0,5 Cu, OK 55 cm; v těchto podmínkách bylo dosaženo 40 r/min. na střed pole (20 X 20 cm) s úbytkem 35 % na okraji. Dávka byla rovněž měřena na parafinovém fantomu ve výši středu těla zvířete dosimetrem Victoreen bez zjištěných rozdílů proti měření na vzduchu. Ozařováno bylo v dávkách 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 a 2000 r. V podmínkách pokusu byla stanovena LD₅₀ = 1265 r při LDh = 1427 r a LDd = 1113 r.

VÝSLEDKY

Sledované hodnoty celkového počtu bílých krvinek jsou shrnuty do grafů, jejichž průběh odpovídá stoupajícím dávkám jonizujícího záření (tab. I a II,

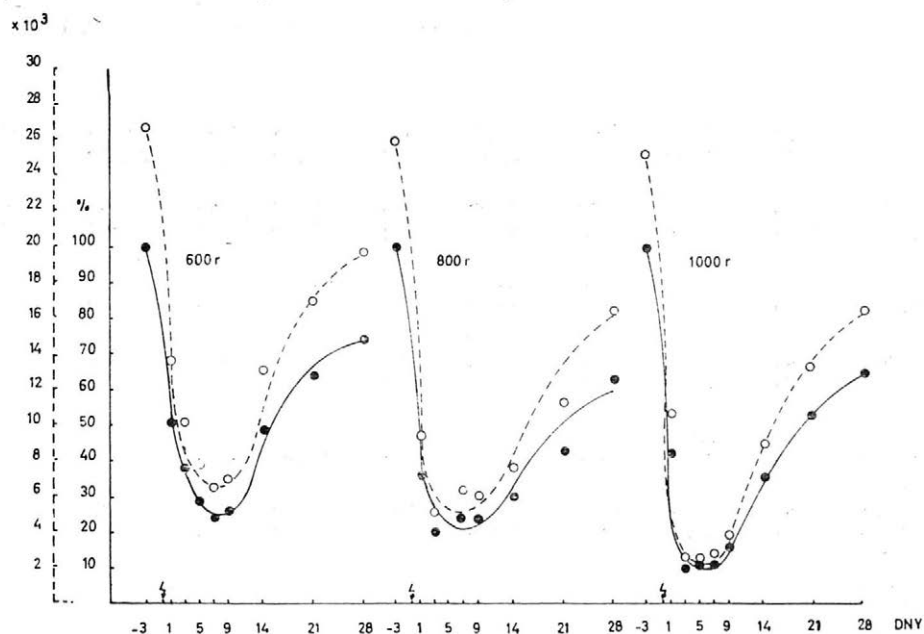
bílých krvinek

7. den		9. den		14. den		21. den		28. den	
Ø	±	Ø	±	Ø	±	Ø	±	Ø	±
6.535 23.400	2520 3135	7.025 23.890	1502 3030	13.185 24.750	3600 2723	17.085 23.270	4643 2759	19.805 23.970	3263 1942
6.458 27.450	2485 1705	6.114 25.960	2522 770	7.792 24.720	2526 442	11.317 24.430	3764 931	16.541 27.690	4166 1602
2.807 24.940	459 530	3.957 25.200	986 355	9.000 24.640	2920 726	13.428 24.940	3133 4373	16.541 27.690	4166 1602
3.637 24.940	2392 4373	3.264 27.690	961 1602	10.572 26.900	3800 2846	17.157 25.890	6131 4588	16.617 26.080	3528 1580
3.775 23.990	552 5695	2.657 23.450	602 4641	6.783 25.320	1101 2436	16.616 27.100	2480 4296	17.758	3214
1.325 17.260	287 3528	3.500 25.320	1055 2436	8.575 27.100	749 4296	14.325 24.800	2080 2290	13.012 23.790	2130 2120
1.000 24.050	1970								

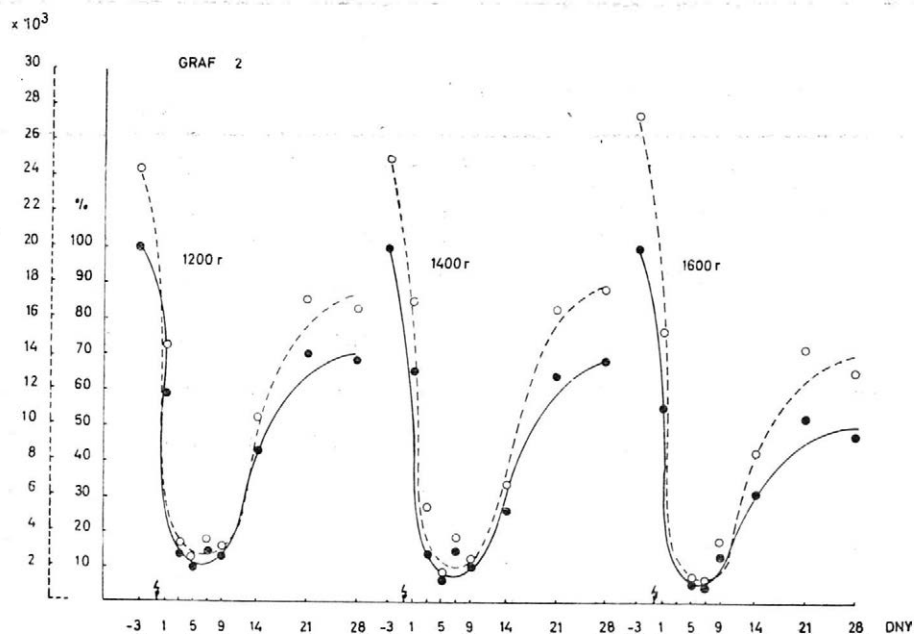
II. Percentuální vyjádření počtu bílých krvinek u ozářené drůbeže

Expozice v r	Percentuální vyjádření počtu bílých krvinek								
	před ozář.	1. den	3. den	5. den	7. den	9. den	14. den	21. den	28. den
600	100	51,3	38,3	29,2	24,5	26,3	49,4	64,0	74,2
800	100	36,8	19,8	—	24,7	23,8	29,8	43,3	63,4
1000	100	42,5	10,3	10,6	11,1	15,7	35,7	53,2	65,6
1200	100	59,4	13,6	9,9	14,6	13,3	43,1	70,0	67,8
1400	100	65,3	13,3	6,5	14,5	10,1	25,9	63,7	68,0
1600	100	55,7	—	5,1	4,8	12,7	31,4	52,0	47,0
1800	100	86,3	11,1	6,6	3,6				
2000	100	—	8,8	6,4					

grafy 1, 2, 3). Obecně je zřejmé, že kritická období, tedy nejhlubší leukopenie, se vyskytovala 3.—7. den po ozáření. Počínaje 9. dnem docházelo k restauraci, jejíž úroveň trvale stoupala až do 28. dne pozorování.

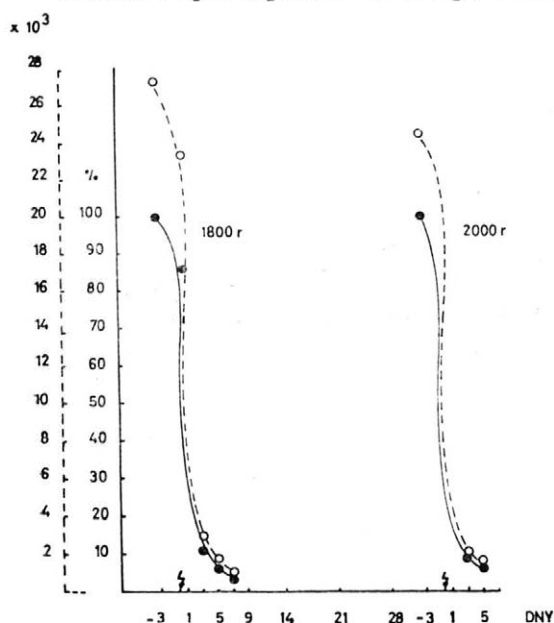


Graf 1.



Graf 2.

Zvlášť zajímavá je odezva bílých krvinek na stoupající dávky jonizujícího záření ze dvou hledisek: jednak z hlediska nejhlubší leukopenie a jednak s ohledem na stupeň reparace 28. den po ozáření. Pokud jde o stupeň leukopenie, bylo



Graf 3.

Graf 1—3. Změny celkového počtu bílých krvinek po ozáření paprsky X a jejich procentuální vyjádření

○ — ○ průměrný počet bílých krvinek
● — ● procento bílých krvinek

lem 14. dne. Jde o nálezy rozdílné od řady našich autorů (Surynek aj., 1950; Dressler aj., 1960, 1962), kteří shledali, že odezva bílé složky krvního obrazu probíhá dvofázově (podobně jako u savců) s druhou slabší leukopenií mezi 20.—30. dnem po ozáření. Tento zjev mohli potvrdit i Mach aj. (1962), kteří zjistili druhou leukopenii i u skupiny kuřat po opakovaném ozařování 1 r denně v průběhu 25 dnů.

Závislost stupně leukopenické odezvy na zvyšující se dávce byla prokázána nejen v tomto souboru slepic ozařovaných přílivem 40 r/min., nýbrž i ve druhém souboru, který byl ozařován přílivem 20 r/min. (graf 5). Průběh hodnot vyjma dávku 900 r, která byla mimochodem dvakrát opakována, je prakticky totožný pro oba soubory.

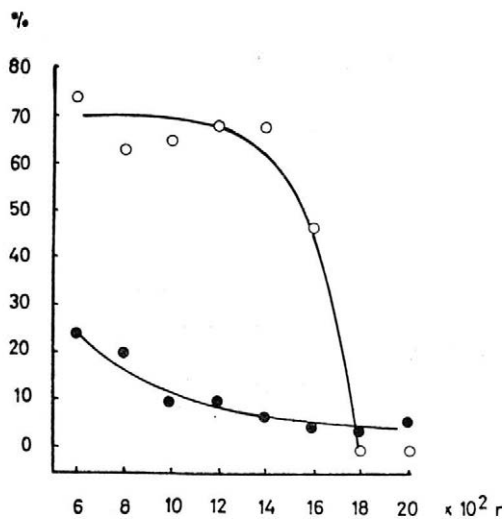
O stupni rekonvalescence v závislosti na dávce záření jsme nemohli zjistit žádné literární údaje. Nutno však poznamenat, že Lucas (1957) připouští rychlejší rekonvalescenci u mladších ptáků než u snášejících slepic. V podmínkách popsaného pokusu bylo zajímavým zjištěním, že i stupeň rekonvalescence byl závislý na stupni celkové expozice. Dávka LD₅₀ byla jakousi hranicí, při které bílé krvinky byly ještě schopny se vyrovnat s poškozením do 60—80 % 28. dne po ozáření. Přibližně LD₅₀ je právě kritickou hranicí zlomu restituční schopnosti organismu, která se projevila mimo jiné i na křivce hynutí ozařovaných ptáků (Procházka, Hampl, 1965).

možno konstatovat, že poměrná odezva odpovídala velikosti expozice až do dávky 1200—1400 r. Počínaje dávkou 600 r, kdy došlo k poklesu bílých krvinek na 25 % výchozí hodnoty, stupeň leukopenie stále klesal. Až ve zmíněné dávce 1200—1400 r bylo dosaženo vyrovnanosti na hranici pohybující se mezi 5—10 % výchozí hodnoty (graf 4).

Restaurace stavu bílých krvinek 28. den je uvedena na témže grafu, ze kterého vyplývá, že od 600 do 1200 r se stupeň obnovy pohybuje mezi 60—80 %. Počínaje dávkou 1400 r dochází k prudkému poklesu, v případě dávky 1600 r na méně než 50 % a konečně u dávek 1800—2000 r je možno považovat stupeň regenerace za nulový vzhledem k tomu, že všichni pokusní ptáci do 14 dnů uhynuli.

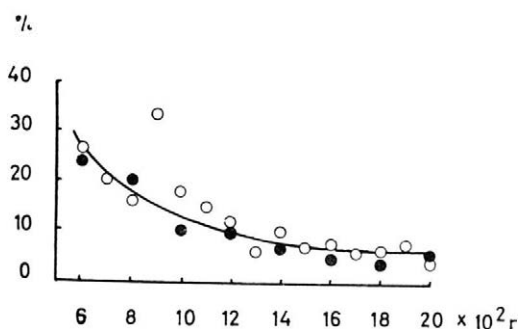
DISKUSE

V souhlase s Lucasem (1957) jsme mohli konstatovat, že po jednorázovém ozáření dochází až do 28. dne pozorování i k jednorázovému poklesu bílých krvinek s nástupem restituce kolem



Graf 4. Stupeň leukopenické odezvy a restituce leukocytů v závislosti na expozici paprsky X

● — ● stupeň restituce leukocytů
○ — ○ stupeň leukopenické odezvy



Graf 5. Stupeň leukopenické odezvy po expozici paprsky X při rozdílném přílivu

příliv 20 r/min.

příliv 40 r/min.

○ — ○ příliv 20 r/min.
● — ● příliv 40 r/min.

SOUHRN

Byla provedena srovnávací studie odezvy bílých krvinek u souboru pokusných kohoutů a slepic, u kterých bylo ve skupinách po 10 kusech prováděno ozařování stoupajícími dávkami ionizujícího záření v rozsahu 600–2000 r rtg-přístrojem za těchto technických podmínek: 175 kV, 15 mA, OK 55 cm, příliv 40 r/min., homogenita pole 20 X 20 cm — 35 % na jeho okraji.

Na základě tohoto sledování bylo možno konstatovat:

a) Stupeň jednorázové leukopenické odezvy je odvislý od dávky ionizujícího záření až přibližně k hranici LD₅₀. Počínaje dávkou 1400 r se její míra pohybuje mezi 5–10 % a dále již neklesá.

b) Stupeň rekonvalescence rovněž harmonuje s přísl. stoupajícími dávkami ionizujícího záření, a to v tom smyslu, že od 600 r do přibližně LD₅₀ dosahuje 28. den 60–80 % původní úrovně bílých krvinek, zatímco dávka 1400 r je hranicí prudkého poklesu až k nulové hodnotě při 100 % hynutí v dávkách 1800 a 2000 r.

Došlo dne 26. 4. 1965

Technická spolupráce M. Dolná.

Literatura

1. Brown, D. G.: Canad. Vet. J. 4 (1963): 50.
2. Dressler, J., Bulský, A.: Spisy vet. fak. Brno 1 (1960): 61.
3. Dressler, J., Mach, P., Surynek, J.: Vet. čas. 9 (1962): 570.
4. Lindop, P. S., Rotblat, J.: Brit. J. Radiol. 35 (1962): 409.
5. Lucas, A. M.: Poultry Sci. 36 (1957): 1290.
6. Mach, P., Surynek, J.:

J., Dressler, J., Krejčí, J.: Vet. Med. 10-11 (1962): 777. — 7. Murray, R. G., Pierce, M., Jacobson, L. O.: Kapt. 13 = In: Zirkle, R. E. „Biological effect of external X and gamma radiation“, part 2, 1956. — 8. Procházka, Z.: Čs. Fysiologie 13 (1964): 259. — 9. Procházka, Z., Hampl, J.: Vet. Med. 1965 (v tisku). — 10. Surynek, J., Mach, P., Jandl, V.: Vet. Med. 10 (1960): 743.

Изменение числа белых кровяных телец у кур после действия повышающегося облучения лучами X

Было проведено сравнительное изучение реакции белых кровяных телец у группы подопытных петухов и кур, которых группами по 10 особей облучали повышающимися дозами ионизирующего облучения в объеме 600—2000 рентгеновском аппарате при следующих технических условиях: 175 кВ, 15 мА, ОК 55 см, мощность дозы 40 мм/мин., однородность поля 20 × 20 см — 35 % на его окраинах.

На основании проведенного изучения можно констатировать:

а) Степень однократной лейкопенической реакции зависит от дозы ионизирующего облучения примерно до границы LD₅₀. Начиная с дозы 1400 их предел колеблется между 5 и 10 % и далее уже не падает.

б) Степень реконвалесценции также гармонирует с соответствующими повышающимися дозами ионизирующего облучения, в частности в том смысле, что от 600 г до приблизительно LD₅₀ достигают на 28 день 60—80 % первоначального уровня белых кровяных телец, в то время как доза 1400 г является пределом резкого падения вплоть до нулевого значения при 100 % гибели в дозах 1800 и 2000 г.

Changes of White Blood Cell Count in Domestic Fowl (*Gallus domesticus*) following the Influence of an Increasing Dose of X-Rays

A comparative study of the response of white blood cells in a set of experimental cocks and hens was carried out. The animals were irradiated in groups per 10 head each with increasing doses of ionizing radiation in the range of 600—2000 r using a rtg-device under the following technical conditions: 175 kV 15 mA, ОК 55 cm, dose rate 40 r/min, homogeneity of the field 20×20 cm — 35 % on its margin.

These observations enabled revealing the following facts:

a) The degree of a single leucopenic response depends on the dose of ionizing radiation approximately up to the limit of LD₅₀. Beginning with the dose 1400 r its rate varies between 5—10 % and does not fall any more.

b) The degree of convalescence is also in harmony with appertaining increasing doses of ionizing radiation; from 600 r up to approximately LD₅₀ it reaches on the 28th day 60—80 % of the original level of the white blood cells whereas the dose of 1400 r represents the limit of a strong decrease as low as to zero value and of following decay by 100 % when doses of 1800 and 2000 r are applied.

Änderungen der Leukozytenzahl beim Haushuhn nach der Einwirkung von steigender Exposition der X-Strahlen

Eine Vergleichsstudie der Leukozytenreaktion bei einer Versuchsgruppe von Hähnen und Hennen, bei denen man in Gruppen von 10 Stück die Bestrahlung mit steigenden Dosen ionisierender Strahlung in einem Umfang von 600—2000 r mittels Roentgengerät vorgenommen hatte, wurde durchgeführt, u. zw. bei folgenden technischen Bedingungen: 175 kV, 15 mA, ОК 55 cm, Zufluß 40 r/min, Homogenität

des Feldes 20×20 cm — 35 % auf dessen Rand. Auf Grund dieser Beobachtung konnte folgendes festgestellt werden:

a) Der Grad der einmaligen leukopenischen Reaktion ist von der Dosis der ionisierenden Strahlung bis zu einer Grenze von annähernd LD₅₀ abhängig. Beginnend mit der Dosis von 1400 r bewegt sich ihre Menge zwischen 5—10 % und senkt sich weiter nicht.

b) Der Grad der Rekonvaleszens steht ebenfalls im Einklang mit entsprechenden Dosen der ionisierenden Strahlung, u. zw. in dem Sinne, daß derselbe von 600 r bis zu cca LD₅₀ am 28. Tag 60—80 % des ursprünglichen Leukozyten-Niveaus erreicht, wogegen die Dosis von 1400 r die Grenze der schroffen Senkung bis zum Nullwert bei 100%igem Absterben bei Dosen von 1800 und 2000 r darstellt.

MVDr. Zdeněk Procházka CSc.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Brno-Medlánky

■ Obecný výklad postupného rozvoje metabolické poruchy v ozářeném organismu předpokládá, že počáteční, analyticky nezjistitelná chemická změna, je metabolickou činností buňky zesílena až k zřejmému funkčnímu a morfologickému poškození. Funkci tohoto „zesilovače“ představují enzymaticky řízené reakce. Tyto okolnosti daly vznik celé řadě teorií o specifickém poškození diskretního enzymatického celku, na jehož základě by byl umožněn teoretický výklad primární poruchy v ozářeném organismu. Ale již jednoduché kvantitativní hodnocení ukazuje, že tento výklad primárního mechanismu jonizujícího záření není reálný (1). Uvažujme strukturálně nezávislé, tj. v buněčné protoplasmě volně rozpustné enzymy. Při průměrné molekulové váze 10^5 činí velikost molekuly 10^{19} cm³, dávka 1000 r vytváří v témže objemu 10^{15} ionizací. To znamená, že pravděpodobnost zasažení enzymatické molekuly je 1 : 10 000. Přímé poškození makromolekuly enzymu i při letálních dávkách *in vivo* není proto pravděpodobné a pokusy to také potvrdily.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Počet experimentů sledujících vliv záření na enzymatické systémy *in vivo* nebo *in vitro* je dnes již prakticky nepřehledný. Původně byly sledovány převážně katabolické reakce a teprve v posledních letech se sledují anabolické, metodicky náročnější reakce v ozářeném organismu. Vliv záření na aktivitu řady enzymů v séru nebo v orgánech nepřinesl žádné závažné osvětlení primární poruchy jonizujícího záření. Příkladem uvádíme stanovení enzymatické aktivity řady enzymů: SGOT*) (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), SGPT (6, 8), LDH (2, 10), MDH (2, 9, 10, 11), aldoláza (2, 6, 10, 12, 13, 14), myokináza (2), hexokináza (2, 14), enoláza (2), pyruvát kináza (2), GDH (2, 10, 15), kreatin kináza (2), alfa-glycerofosfát dehydrogenáza (2), fosfoglycerát kináza (2, 10), GAPDH (2, 10), glukózo-6-fosfatáza (16, 17) glukózo-6-fosfát dehydrogenáza (10, 17, 18, 19), TIS (10), dehydrogenáza kyseliny jantarové (10, 20), oxydáza kyseliny jantarové (10, 21, 22), ATP-áza (23, 24, 25), ADH (26), 6-fosfo-glukonát dehydrogenáza (17), fosfohexoisomeráza (17), fosfoglukomutáza

*) Vysvětlivky jednotlivých zkratk uvedených v textu.

ADH = dehydrogenáza alkoholu, DPN (DPN⁺) = diphosphopyridinnukleotid (nikotin-amid-adenin-dinukleotid), DPNH = redukovaný DPN, FAD = flavin-adenin-dinukleotid, GAPDH = fosfoglyceraldehyd dehydrogenáza, GDH = dehydrogenáza kyseliny glutamové, LDH = dehydrogenáza kyseliny mléčné, MDH = dehydrogenáza kyseliny jablečné, TTC = trifenyltetrazolium chlorid.

(17), kataláza (27), RNK-áza (28, 29), 5-nukleotidáza (23), cholinesteráza (24, 25), DNK-áza (30, 31), cytochrom oxydáza (32), koenzym A (13).

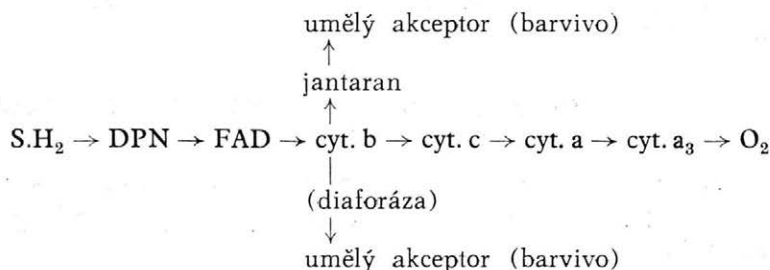
Zhodnotíme-li vliv záření na enzymatické systémy *in vivo*, lze říci, že po ozáření je pozorováno krátkodobě zvýšení obou transamináz, aldolázy, dehydrogenázy kyseliny mléčné a i některých jiných protoplasmatických enzymatických systémů. Toto zvýšení lze přičísti na vrub destrukčním procesům radiosenzitivních tkání hlavně lymfocytů a buněk Lieberkühnových krypt a je nespecifickým a obecným výrazem eliminace poškozených buněk.

Jiný aspekt primární chemické reakce představuje poškození organizovaných enzymatických systémů. Organizované buněčné elementy, jako mitochondrie a mikrosomy, mají větší pravděpodobnost, že budou primárně zasaženy ionizujícím zářením. Objem mitochondriální částice činí 10^{-16} cm³, a při 10^{15} jonizací v 1 cm³ při dávce 1000 r, je pravděpodobnost zásahu mitochondriální částice velmi vysoká. Jestliže tato částice obsahuje strukturálně vázaný řetěz enzymů, může již poškození jednoho enzymu v řetězci vyvolat funkční poruchu celé mitochondriální partikule. U mikrosomů, velikých cca 200 Å je pravděpodobnost zásahů 1 : 250. Z tohoto hlediska by byly mikrosomy méně citlivé vůči ozáření. Ovšem nálezy posledních let (33, 34) ukazují, že efektivní jednotkou syntézy bílkovin jsou polysomy, tj. agregáty mikrosomů spojených pomocí messenger RNK, a tím jsou dána nová hlediska na možnou inhibici enzymů po ozáření. Anaboličké reakce jsou sledovány hlavně v izolovaných strukturách, jako v jádře, v jadérku a v mikrosomech, a v posledních letech je zjišťována radiosenzitivita těchto reakcí. Modelové experimenty na regenerujících játrech ukázaly, že v synchronním stavu dělení je radiosenzitivní především induktivní syntéza enzymů, umožňujících další tvorbu DNK, dále fosforylace a syntéza prekurzorů nukleových kyselin. Vzhledem k náročné metodice a nedostatečně objasněným fyziologickým funkcím těchto buněčných součástí, není vliv záření na tyto systémy prakticky znám.

Většina prací, sledujících vliv záření na enzymatickou aktivitu *in vitro* nebo *in vivo*, je proto provedena s protoplasmatickými, tj. volnými, a mitochondriálními, tj. strukturálně vázanými enzymy. Velmi zajímavá z tohoto hlediska je možnost ovlivnění dehydrogenáz v ozářeném organismu. Dehydrogenace probíhá v organismu přes intermediát radikálové povahy. Otázka ovlivnění dehydrogenáz po ozáření není rozřešena a experimentální nálezy jsou protichůdné. Květina a Grossman (35) zjistili útlum dehydrogenázy kyseliny jantarové v homogenátu jater krys po celotělovém ozáření. Ledencev (36) pozoroval snížení dehydrogenázy kyseliny glutamové 7. den po ozáření Ryser a spol. (37) nezjistili změny v aktivitě dehydrogenázy kyseliny jantarové. Považovali jsme proto za vhodné sledovat dehydrogenázovou kapacitu ozářených jater v časových intervalech po ozáření v jaterních homogenátech a mitochondriích, na endogenním substrátu, jednak na řadě exogenních substrátů, které by favorizovaly daný enzym.

Elektronový přenos v organismu je umožněn enzymatickým systémem aerobních a anaerobních dehydrogenáz a oxydáz. Při značném počtu známých enzymů je podstatně omezena skupina koenzymů, kterou můžeme zahrnouti do skupiny pyridin nukleotidů, flavin nukleotidů a Fe porfyrinů. Vhodnou metodou pro sledování biologické dehydrogenace je Thunbergova metoda pro stanovení anaerobních dehydrogenáz, která doplňuje Warburgovu manometrickou metodu pro stanovení oxydáz a aerobních dehydrogenáz. V posledních letech zavedením vhodných akceptorů vodíku, které nejsou autooxydabilní a jejichž redukovaná forma je zbarvená, se neobyčejně rozšířila možnost sledování dehydrogenáz (38,

39, 40, 41, 42, 43). Při Thunbergově technice sledujeme dehydrogenační aktivitu za pomoci vhodných akceptorů vodíku, které během reakce vytvářejí produkty s charakteristickým absorpčním maximem. Rychlost tvorby produktu pak umožňuje sledovat kinetiku dané reakce. Aby mohl enzym katalyzovat přenos vodíku ze substrátu na akceptor (barvivo), musí mít akceptor vyšší redox potenciál než donátor. Organická redox barviva ať již reverzibilní nebo irreverzibilní zasahují v určitých místech respiračního řetězce. Přesná lokalizace těchto míst není známa. Umístění redox barviva jako akceptoru vodíku v respiračním řetězci se uvádí podle schématu:



Prošetřili jsme proto vliv ionizujícího záření na aktivitu dehydrogenázové kapacity jaterních homogenátů a mitochondrií, připravených z jater krys ozářených celotělovou dávkou 800 r Co^{60} .

MATERIÁL A METODIKA

K pokusům jsme použili bílé krysy Wistar, samčího pohlaví. Zvířata byla ustájena za standardních podmínek v drátěných klecích, vždy po 20 kusech. Byla pravidelně jednou denně krmena Larsenovou dietou, voda ze skleněných napáječek *ad libitum*. K pokusům byla vybírána zvířata ve váze 170 až 190 g. Před zabitím zvířata 16 hodin hladověla, voda *ad libitum*. Technické podmínky ozáření: Ozařování bylo prováděno na vlastním ozařovacím zdroji Co^{60} s přílivem 2,5 r za minutu (vzdušná dávka proměřena na Victoreen Standardu) celotělovou dávkou 800 r.

PREPARACE MITOCHONDRIÍ Z KRYŠÍCH JATER

Bezprostředně po zabití se vyjmou játra a vychladí v ledovém roztoku 0,25 M sacharózy. Játra se homogenizují v celoskleněném homogenizátoru (vhodnější je volnější píst) v zředění 1 : 10. Izolační medium: 0,25 sacharóza + + 0,001 EDTA + 0,02 TRA pH 7,4. Izolace byla provedena v chlazené odstředivce KS Junior Christ. Během izolačního postupu teplota nepřekročila 3°C.

Izolační postup:

- I. 700 g (1200 otč/min), 10 minut, sediment se zahodí.
- II. 5000 g (2200 otč/min), rychlostní nástavec, dvakrát 15 min., supernatant se zahodí.
- III. Sediment se resuspenduje a odstředí při 20 000 g (4800 otč/min. rychlostní nástavec) 15 minut.

Čistota preparátu byla kontrolována pod fázovým kontrastem.

Izolovaná mitochondriální suspenze byla standardizována podle obsahu bílkovin.

STANOVENÍ BÍLKOVIN BIURETOVÝM REAGENS V MITOCHONDRIÍCH

Potřeby: Biuretovo reagens (1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 6,0 g $\text{NaKC}_4\text{H}_3\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 500 ml vody, pak se smíchá s 300 ml 10 % NaOH a doplní na 1 litr roztoku), aceton:butanol 2:1, Tween 80. Provedení reakce: 0,5 ml Tween 80 + 0,5 mitochondriální suspenze + 0,5 ml pufrované sacharózy + 8,0 ml biuretova reagens. Systém byl ponechán 20 minut při teplotě místnosti, pak se přidaly 4 ml směsi butanol:aceton a proměřila absorpce při 540 m μ (spektrofotometr Zeiss VSU 1, flintové prizma, 1356 dílků monochromátoru); koncentrace mitochondrií byla pak vyjádřena v mg bílkoviny standardního vzorku hovězího albuminu.

STANOVENÍ DEHYDROGENÁZOVÉ AKTIVITY JATERNÍCH HOMOGENÁTŮ A MITOCHONDRIÍ REDUKCÍ TRIPHENYLTETRAZOLIUM HCl (TTC)

Enzymatickou dehydrogenaci se redukuje TTC na nerozpustný červený formazan, který lze kvantitativně po rozpuštění v organických rozpustidlech spektrofotometricky stanovit.

Potřeby: 1% vodní roztok TTC, inkubační medium (2 díly KH_2PO_4 2,11 %, 100 dílů NaCl 1,7 %, 8 dílů KCl 1,15 %, 6 dílů CaCl_2 1,22 %, 2 díly $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 3,82 %, 6 dílů NaHCO_3 1,36 %, 6 dílů směsi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,75 % a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,38 % v poměru 1:4), 0,1 M kyselina mléčná (jantarová, alfa-glycerofosforečná, glutamová, alfa-ketoglutarová a pyrohroznová upravené vždy na pH 7,6).

Provedení: Játra byla homogenizována v celoskleněném pístovém homogenizátoru v ředění 1:12 inkubačním mediem. Dehydrogenázová aktivita byla stanovena jednak na endogenním substrátu, jednak se substrátem kyseliny jantarové, ketoglutarové, mléčné, pyrohroznové, glutamové a glycerofosforečné. Měřicí systém: 1,0 homogenátu, 1,0 ml bidest H_2O , 0,5 ml izolačního media (nebo 0,5 ml substrátu), 0,5 ml TTC. Systém byl temperován na inaktivační lázni při 37° C 15 minut, reakce byla zastavena přidáním 5,0 ml redestilovaného butanolu, vyredukovaný formazan byl extrahován do butanolvé fáze, odstředěn a proměřen na spektrofotometru Zeiss VSU 1, kyveta 10 mn, flintové prizma, 483 m μ tj. 1422 dílků monochromátoru.

Stanovení dehydrogenázové aktivity v mitochondriích. Provedení bylo obdobné jako v homogenátech. Měřicí systém: 1,0 ml mitochondriální suspenze, 1,0 ml substrátu, 1,0 ml TTC. Systém byl temperován při 37° C. 30 až 60 minut, reakce byla zastavena přidáním 5,0 ml redestilovaného butanolu a proměřena stejným způsobem jako v homogenátech. Koncentrace mitochondrií byla stanovena s biuretovým reagens.

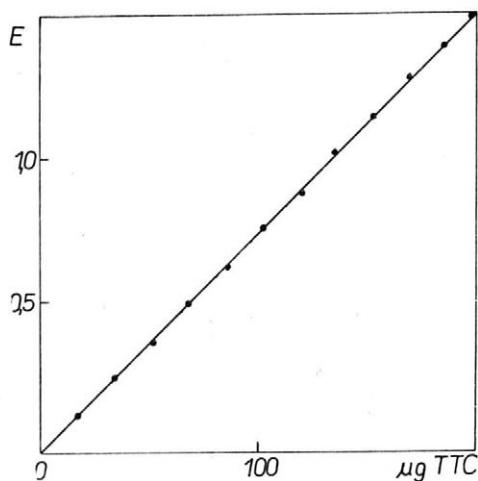
Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno t-testem.

VÝSLEDEK A ZHODNOCENÍ

V první části práce jsme stanovili dehydrogenační aktivitu jaterního homogenátu jednak bez přidání substrátu (endogenní substrát), jednak v homogenátech obohacených exogenními substráty do finální koncentrace 0,1 M. Kalibrační křivka má lineární průběh do koncentrace 200 μg , jak je patrné z grafu 1. Hodnotu aktivity dehydrogenáz jsme vyjadřovali v μg TTC/1 hod./1 g vlhké tkáně

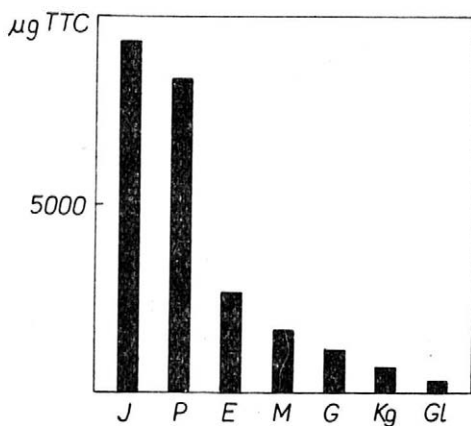
Redukce TTC jaterním homogenátem je značně závislá na přítomnosti jed-

notlivých exogenních substrátů. Z použitých substrátů má nejvyšší redukční mohutnost kyselina jantarová a pyrohroznová. Ostatní zkoušené substráty, a to kyselina alfa-ketoglutarová, mléčná, glutamová a alfa-glycerofosfát vesměs snižovaly redukcí TTC oproti endogennímu substrátu. Aktivita dehydrogenáz v normálním jaterním homogenátu v různých substrátech je uvedena na grafu 2. Aktivita na endogenním substrátu neodpovídá ovšem skutečně *in vivo*, protože homogenizace poruší faktor strukturální uspořádanosti. Koncentrace substrátu



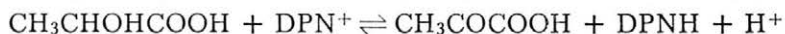
Graf 1. Kalibrační křivka formazanu po redukcí TTC

Vodný roztok TTC byl redukován dithioničtanem sodným, sraženina vzniklého formazanu byla rozpuštěna v n-butanolu a barevná intenzita vzniklého roztoku byla proměřena při 483 nm, kyveta 1 cm, spektrofotometr Zeiss VSU 1



Graf 2. Vliv substrátu na redukcí TTC v jaterním homogenátu normálních kryš. J = kyselina jantarová, P = kyselina pyrohroznová, E = endogenní substrát, M = kyselina mléčná, G = kyselina α -glycerofosforečná, Kg = kyselina α -ketoglutarová, Gl = kyselina glutamová.

je zde omezena a uplatní se soutěživost jednotlivých redox dvojic substrátu při využívání koenzymů a TTC jako akceptoru vodíku. Zdá se, že poměr $DPN^+/DPNH$ je pro všechny metabolity v homogenátu stejný a že jej dvojice DPN závislých substrátů využívají zcela podle thermodynamických zákonů daných rovnovážnými konstantami. Svědčí pro to pozorování H o h o r s t a (44). Redukce TTC se proto musí zastavit, i když nejsou donátory vodíku vyčerpány, a to tak, jak to odpovídá jejich rovnovážným konstantám. Uvedme příkladem rovnovážný stav kyseliny mléčné/kyseliny pyrohroznové, který je dán rovnicí:

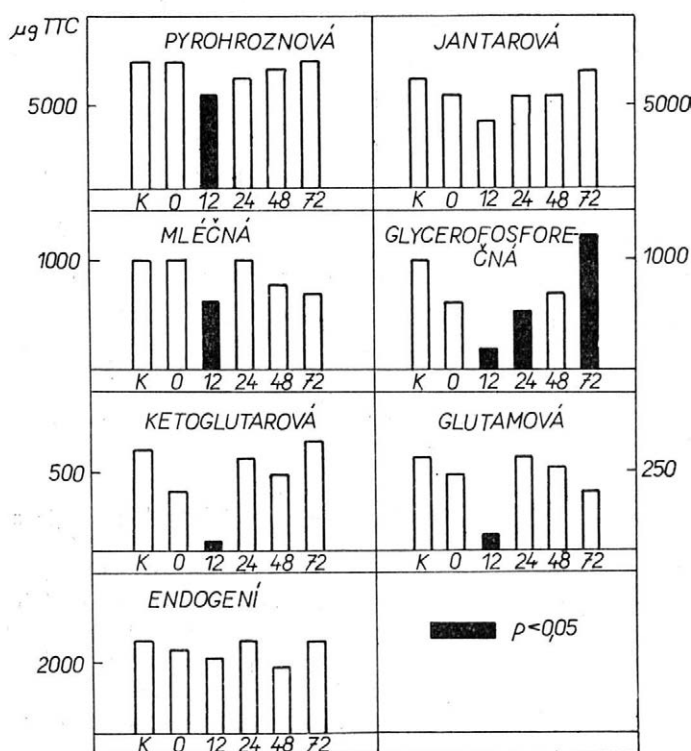


Vyjdeme-li z thermodynamických úvah homogenního systému, pak lze rovnovážnou konstantu vypočítati z podmínky rovnosti potenciálů obou redoxů. Je-li $E'_0 = -0,180$ V redox potenciál mléčná/pyrohroznová a $-0,320$ V redox potenciál $DPNH/DPN^+$, je v rovnovážném stavu splněna podmínka rovnosti potenciálu a platí:

$$\frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{mléčná}] \cdot [DPN^+]}{[\text{pyrohroznová}] \cdot [DPNH]} = 0,320 - 0,180$$

z čehož vychází hodnota konstanty $K = 6,76 \cdot 10^4$. Rovnováha je tedy posunuta prakticky zcela doleva a reakce probíhá ve prospěch tvorby kyseliny mléčné. V játrech činí poměr kyseliny mléčné k pyrohroznové 20 : 1 a podle toho by také v játrech převládala oxydovaná forma pyridin nukleotidů.

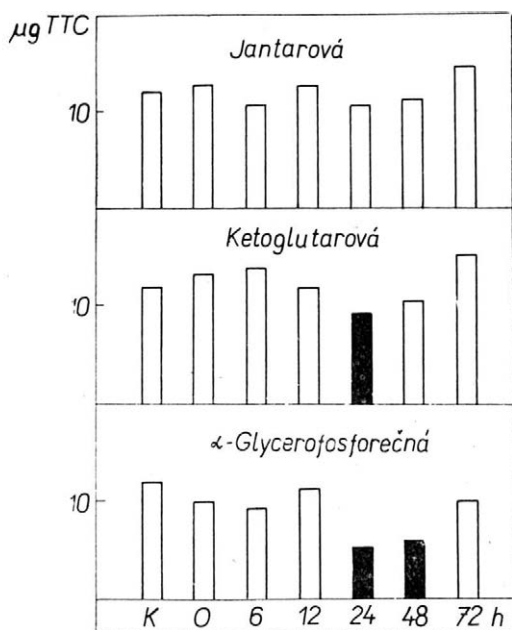
V případě, že obohatíme homogenát kyselinou mléčnou, je automaticky dosaženo rovnovážného stavu a bude proto bržděna oscilace $DPN^+/DPNH$. Lze tedy očekávat sníženou formu formazanu, což také experiment potvrzuje. Přidáním kyseliny pyrohroznové je reakce posunuta doprava, proto nastává intenzivní oscilace $DPN^+/DPNH$, aby bylo dosaženo rovnovážného stavu. Skutečně také přidáním kyseliny pyrohroznové se zvyšuje redukce TTC. Podobně jako kyselina mléčná snižuje redukci také α -glycerofosfát. Kyselina α -ketoglutarová a glutamová rovněž snižují tvorbu TTC vzhledem k endogennímu substrátu. Nadbytek α -ketoglutarové nemůže podpořit tvorbu formazanů, protože přeměna na kyselinu jantarovou se děje cestou oxydační dekarboxylace a podobná je metabolisace kyseliny glutamové, která přes imino-derivát vytváří kyselinu α -ketoglutarovou.



Graf 3. Vliv jonizujícího záření na redukci tetrazoliových solí katalyzovanou jaterním homogenátem krys ozářených celotělovou dávkou 800 r

Vliv jonizujícího záření na dehydrogenační aktivitu jaterního homogenátu krys ozářených celotělovou dávkou 800 r Co^{60} je uveden na grafu 3. V sledovaných intervalech po ozáření se nemění signifikantně tvorba formazanu na endogenním substrátu. Podobně nenastává signifikantní pokles aktivity dehydroge-

názy kyseliny jantarové, i když je pozorován zřejmý trend k snížení 12 hodin po ozáření. Signifikantní změna naproti tomu byla zjištěna u všech dehydrogenáz vyžadujících koenzym I, a to s maximálním snížením 12 hodin po celotělovém ozáření. Nejvýraznější je tato změna na substrátu kyseliny α -ketoglutarové, dále pak glutamové, α -glycerofosforečné, mléčné a pyrohroznové. Již v intervalu 24 hodin po ozáření se změny prakticky normalizují. Protože rozsah redukce TTC v jaterním homogenátu na endogenním substrátu není po ozáření signifikantně pozmeněn, nelze v uvedeném technickém uspořádání pokusu považovat pozorované snížení za přímé poškození enzymatické aktivity.



Graf 4. Vliv ionizujícího záření na redukci tetrazoliových solí katalyzovanou jaterními mitochondriemi krys ozářených celotělovou dávkou 800 r. Černé sloupce jsou statisticky významné změny $P < 0,01$

V homogenátech, obohacených substráty vyžadujících k dehydrogenaci pyridin nukleotidy, je ovšem pozorován v intervalu 12 hodin po ozáření pokles dehydrogenační aktivity. Protože tvorba formazanu vyžaduje zde vyšší účinnou koncentraci pyridin nukleotidů, lze uvažovat, že v ozářených homogenátech dochází k poklesu stacionární koncentrace pyridin nukleotidů. Tato změna se neprojevuje v poklesu redukce na endogenním substrátu, kdy je koncentrace metabolitů malá, a proto i nižší koncentrace DPN stačí udržet redukci tetrazoliových solí. Je-li pak homogenát obohacen substrátem, je zesílena oscilace $DPN^+/DPNH$ a nedostatek tohoto koenzymu se projeví v snížení redukce TTC. Přidaný exogenní substrát představuje tak vlastně zátěž, kdy homogenát musí mnohem intenzivněji využívat pyridin nukleotidy, a proto i relativní nedostatek, který stačí k udržení funkce na endogenním substrátu, již nestačí pro zátěžový stav.

V další části práce jsme sledovali vliv záření na dehydrogenázovou aktivitu mitochondrií, izolovaných z jater krys ozářených celotělovou dávkou 800 r Co^{60} . Izolované mitochondrie v systému bez substrátu neredukují TTC a nevytvářejí přirozeně formazan ani po přidání endogenního substrátu kyseliny mléčné a glutamové. Vliv ionizujícího záření na redukci TTC je uveden na grafu 4. Obdobně jako v homogenátu jater se nemění po ozáření aktivita dehydrogenázy kyseliny

jantarové, vyjádřená na jednotkové množství bílkoviny v izolovaných mitochondriích. Signifikantní snížení jsme pozorovali 24 hodin po expozici v aktivitě dehydrogenázy kyseliny glutamové a α -glycerofosforečné. Toto snížení se vesměs 72 hodin po ozáření upravuje k normálním hodnotám.

Shrňme-li pozorované změny, lze uzavřít, že v ozářených játrech dochází k dočasnému útlumu aktivity dehydrogenáz, vyžadujících jako koenzym pyridin nukleotidy. Podobná změna je pozorována v mitochondriální suspenzi 24 hodin po ozáření. Protože redukce TTC na endogenním substrátu není po ozáření změněna, nejde pravděpodobně o přímé poškození enzymatické aktivity, ale spíše o poruchu koenzymu.

SOUHRN

Po celotělovém ozáření dávkou 800 r Co^{60} byla sledována dehydrogenační aktivita pomocí redukce trifenylnitrazoliových solí v homogenátu a v mitochondriích jater ozářených krys.

Po ozáření se nemění dehydrogenační aktivita na endogenním substrátu a na substrátu kyseliny jantarové. Naproti tomu bylo pozorováno přechodné snížení aktivity u substrátů, jejichž dehydrogenace vyžaduje pyridin nukleotidy.

Došlo dne 3. 5. 1965

Literatura

1. Butler, J. A. V.: Biochemical Actions of Ionising Radiation, v IXth International Congress of Radiobiology, Vol. 2, vydal B. Rajewsky, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1961. — 2. Albaum, H. G.: Radiation Res. 12 (1960), 186. — 3. Kessler, G., Hermal, M. B., Gershon-Cohen, J.: Proc. Soc. expt. Biol. Med. 98 (1958), 201. — 4. Brent, R. L., Berman, H., McLaughlin, M., Stabile, J.: Radiation Res. 7 (1957), 305. — 5. Milch, L. J., Albaum, H. G.: Proc. Soc. expt. Biol. Med. 93 (1956), 595. — 6. Skalka, M.: Folia Biologica 7 (1961), 275. — 7. Becker, F., Williams, R. B., Voogd, J., Istock, J.: Abstracts of the IXth Annual Meeting of the Radiation Research Soc., Washington, May 15-17, 1961 v Radiation Research 14 (1961), 450. — 8. Micukashi, M.: J. Japan Biochem. Soc. 34 (1962), 331. — 9. Amoroso, G., Lorenz, W., Lössen, H., Oswald, H.: Strahlentherapie 121 (1963), 269. — 10. Maass, H.: Strahlentherapie 35 (1956), 171. — 11. Volek, V., Dienstbier, Z.: Čas. lékařů čes. 78 (1960), 264. — 12. Dalos, B.: Nature 190 (1961), 817. — 13. Hawrylewitz, E. J.: Abstracts of IXth Annual Meeting of the Radiation Research Soc., Washington May 15-17, 1961 v Radiation Res. 14 (1961), 473. — 14. Sahasrabudhe, M. B., Nerurkar, M. K., Baxi, A. J.: Inter. J. Radiat. Biol. 1 (1959), 52. — 15. Ababei, L., Schiau, S., Čapiln, S., Ghizari, E., Stonescu, H., Stefanescu, P.: Nature 196 (1962), 1223. — 16. Coniglio, J. G., Kirchman, J. C., Hudson, G. W.: Am. J. Physiology 191 (1957), 350. — 17. Weber, G., Cantera, A.: Am. J. Physiology 197 (1959), 1284. — 18. Dubois, K. P., Raymund, A. B., Hietbrink, B. E.: NSA 17 (1963) citace 10479. — 19. Kočetov, G. A.: Biochimija 25 (1960), 70. — 20. Höhne, G., Künkel, H. A.: Klin. Wochschr. 33 (1955), 567. — 21. Le May, M.: Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 77 (1951), 337. — 22. Tanaka, S., Ganno, S., Hatano, H.: J. Rad. Res. (Japan) 1 (1960), 120. — 23. Du Bois, K. P., Peterson, D. F.: Am. J. Physiology 176 (1954), 282. — 24. Ezz, E. A., Du Bois, K. P.: Report NP-9857 podle NSA 15 (1961), citace 10684. — 25. Hientbrink, B. E., Raymund, A. B., Zins,

G. R.: NSA 17 (1963), citace 19875. — 26. Shozo, T., Hiroyuki, H., Shigetake, G.: Biochem. J. 46 (1959), 925. — 27. Yanagisawa, T., Hiramatsu, N., Iwasaki, Z., Toda, H.: Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi 20 (1961), 2776 podle NSA 16 (1962), citace 8606. — 28. Maor, D., Alexander, P.: Inter. J. Radiat. Biol. 6 (1963), 93. — 29. Roth, J. S., Eichel, H. J.: Radiation Res. 11 (1959), 572. — 30. Kurnick, N. B., Massey, B. W., Sandeen, G.: Radiation Res. 11 (1959), 101. — 31. Goutier-Pirotte, M., Goutier, R.: Radiation Res. 16 (1962), 728. — 32. Pozza, F., Versa, G.: Atti ist. veneto sci. lettere et arti, Classe sci. mat. e nat. 117 (1959), 247 podle NSA 14 (1960), 12. — 33. Warner, J. R., Konpf, P. M., Rich, A. B.: Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 49 (1963), 122. — 34. Jackson, R. J., Munro, A. J., Korner, A.: Biochem. J. 89 (1963), 11 P. — 35. Květiná, J., Grossman, V.: Biochem. Pharmacology 3 (1961), 52. — 36. Ledencev, J. K.: Radiobiologija 3 (1963), 29. — 37. Ryser, H., Aebi, H., Zuppinger, A.: Experientia 10 (1954), 304. — 38. Slater, T. F.: Nature 183 (1959), 1679. — 39. Slater, T. F.: Biochem. J. 73 (1959), 314. — 40. Slater, T. F., Planterose, D. N.: Biochem. J. 74 (1960), 591. — 41. Williams, C. H., Gibbs, R. H., Kamin, H.: Biochem. Biophys. Acta 32 (1959), 568. — 42. Slater, T. F.: Biochem. J. 86 (1963), 6 P. — 43. Pádr, Z.: Tetrazoliové soli. Stát. Zdrav. Nakl., Praha, 1959. — 44. Horst, H. J., Kreutz, F. H., Bücher, Th.: Biochem. Z. 322 (1959), 18.

Влияние облучения на активность некоторых дегидрогеназ в печеночных гомогенатах и митохондриях крыс

После облучения всего тела дозой 800 r Co^{60} изучалась дегидрогеназная активность с помощью редукции трифенилтетразолиевых солей в гомогенате и в митохондриях печени облученных крыс.

После облучения дегидрогеназная активность не меняется на эндогенном субстрате и на субстрате янтарной кислоты. И наоборот, наблюдалось временное снижение активности у субстратов, дегидрогеназация которых требует пиридина нуклеотида.

Influence of Radiation on the Activity of some Dehydrogenases in Liver Homogenates and in Mitochondriae of Rats

Dehydrogenating activity was traced by means of reduction of triphenyltetrazolium salts in homogenate and in mitochondriae of liver of irradiated rats after the whole-body irradiation at the dose 800 r Co^{60} .

Dehydrogenating activity in the endogenous substrate and in the amber acid — substrate does not change after irradiation. On the contrary a transient decrease of activity was observed in substrates requiring pyridine — nucleotides when dehydrogenated.

Einfluß der Strahlung auf die Aktivität einiger Dehydrogenasen in den Leber-Homogenaten und Mitochondrien der Ratten

Nach einer Körperbestrahlung mit 800 r Co^{60} verfolgte man die Dehydrierungsaktivität mittels der Reduktion von Triphenyl-tetrazol-Salzen im Homogenat und in den Mitochondrien der Leber der bestrahlten Ratten.

Nach der Bestrahlung tritt keine Änderung des endogenen Substrates und des Substrates der Jantarsäure ein. Demgegenüber bemerkte man eine vorübergehende Herabsetzung der Aktivität bei Substraten, deren Dehydrierung Pyridin-Nukleotiden erfordert.

MVDr. Blahoslav Zícha

Veterinární výzkumné středisko,
Praha - Motol

■ Při studiu časných biochemických změn, vznikajících v ozářené tkáni ať již bezprostředně během expozice nebo v intervalu těsně po ozáření vystupuje do popředí problém vzniku peroxydových látek a objasnění jejich biologického účinku v organismu, o čemž svědčí mimo jiné i vydání 3 monografií v posledních letech (1, 2, 3). Radikály, vznikající nepřímým účinkem záření, mohou za daného parciálního tlaku kyslíku, jaký je v tkáních, vytvářet řadu organických peroxydů a hydroperoxydů. V této souvislosti jsou velmi zajímavé oxydační produkty nenasycených mastných kyselin. Tyto kyseliny jak známo mají v řadě případů esenciální charakter a četné z nich jako kyselina linolová a linolenová řadíme k vitamínům. Nenasycené mastné kyseliny jsou vázané na fosfolipidy součástí všech živočišných membrán.

Organismus si přirozeně vytváří již za fyziologického stavu účinnou anti-oxydační obranu, aby zabránil vzniku těchto oxydačních produktů (4). Jonizující záření jako zdroj radikálů s oxydačním účinkem může vytvářet organické hydroxyperoxydy nenasycených mastných kyselin. Důležité je, že tyto oxydační produkty mohou mít podle své chemické povahy řetězový charakter, a tak mohou zvyšovat biologický účinek jonizujícího záření. Pro vysvětlení možného biologického účinku jonizujícího záření je neméně důležité, že ultrastruktury v buňce jako jsou mitochondrie a ribosomy obsahují značný podíl nenasycených mastných kyselin. Protože hydroxyperoxydy těchto kyselin jsou rozpustnější, mohou tyto změny přispívat k pozorovaným poruchám permeability těchto struktur. Tento směr je tím zajímavější po zjištění přímých funkčních vlastností těchto lipidů pro elektronový transport v mitochondriální partikule. Lipoidní micela je tak přímou jednotkou oxydační fosforylace, protože představuje rozpustnou fázi pro cytochrom c a koenzym Q (5).

Analytický důkaz existence peroxydů v analyticky zjiitelném množství je doposud sporný, vzhledem ke krátkodobé existenci radikálů a snadné dekompenzaci peroxydů. Dosavadní výzkum naráží na řadu potíží hlavně proto, že analytika organických peroxydů v biologickém materiálu není dostatečně propracována. Stále se ještě bezpečně neví, zda zdravé organismy obsahují peroxydy, nebo zda k peroxydaci nenasycených mastných kyselin dochází až během izolačního postupu (6). V radiobiologické problematice je otázka hydroxyperoxydů řešena v několika směrech.

1. Analytický důkaz peroxydů a oxydačních látek v ozářeném organismu.
2. Antioxydační faktory v organismu a jejich ovlivnění jonizujícím zářením.
3. Chemická protekce eventuálně terapie nemoci z ozáření jako blokáda tvorby hydroxyperoxydů.

V posledních letech je pro analytický důkaz oxydačních produktů nenasyčených mastných kyselin široce využívána barevná reakce s kyselinou 2-thiobarbiturovou (dále TBK). Reakce byla popsána v roce 1944 (7) a i když není specifická pro hydroxyperoxydy, rozšířila se hlavně pro svoji jednoduchost, (8, 9, 10). Podstatou reakce TBK je tvorba oranžového trimethinového barviva, vznikající kondenzací jedné molekuly malonyldialdehydu, vznikajícího peroxydací trienů a vyšších, se dvěma molekulami TBK za odštěpení dvou molekul vody.

Při aerobní inkubaci dostatečně zředěných homogenátů je tato reakce pozitivní a zvyšuje se s dobou inkubace. Pozitivní reakci dávají ovšem pouze orgány s malou mitotickou aktivitou jako např. játra, mozek, ledvina, kdežto orgány s vysokou mitotickou aktivitou jako např. kostní dřeň nebo mukóza tenkého střeva tuto reakci nedávají. Mitotické aktivní tkáně obsahují tedy speciální anti-oxydační faktory brzdící oxydaci nenasyčených mastných kyselin. Tato aktivita zřejmě souvisí s metabolickou cdlišností dělící se buňky, jak jsme prokázali na modelu normální a regenerující jaterní tkáně (11).

V této práci jsme sledovali vliv ionizujícího záření jednak *in vivo* jednak *in vitro* na tvorbu oxydačních produktů nenasyčených mastných kyselin v játrech, mitochondriích a tenkém střevě krysy.

MATERIÁL A METODIKA

Pokus byl proveden na krysách Wistar, samcích o váze 160–180 g. Zvířata byla krmena Larsenovou dietou a dostávala vodu *ad libitum*. Den před pokusem zvířata hladověla. V pokusech *in vivo* byla zvířata ozářena v plastické schránce z polymetylakrylátu, která byla konstruována tak, aby se zvířata během expozice nemohla pohybovat. Ozařovací zdroj: Makrophos 250, 235 kV, 14 mA, filtr 0,5 mm Cu, 1 mm Al, příliv 70 r/min.

Stanovení oxydačních produktů nenasyčených mastných kyselin reakcí s TBK. Potřeby: fosfátový ústoj pH 5,9, 0,05 M, 1 % kyselina 2-thiobarbiturová pH 7,0; 5 % kyselina trichloroctová.

Pokusné krysy byly omráčeny úderem na hlavu a vykrveny prostřížením krčních cév. Vzorek jater cca 500 mg byl vychlazen v ledovém ústoji a homogenizován v celoskleněném pístovém homogenizátoru a doplněn ústojem na ředění 1 : 50. Tenké střevo bylo promyto ledovým ústojem, zbaveno zbytku omenta a homogenizováno v nožovém homogenizátoru MSE s fosfátovým ústojem a doplněno na ředění 1 : 30.

PREPARACE MITOCHONDRIÍ

Bezprostředně po zabíjení byla vyjmuta játra a vychlazená v ledovém roztoku 0,25 Mcl. sacharózy. Játra byla homogenizována v celoskleněném pístovém homogenizátoru v zředění 1 : 10. Izolace byla provedena v chlazené odstředivce Christ Junior III. Během izolačního postupu teplota nepřekročila 3° C.

IZOLAČNÍ POSTUP

- I. 700 g (1200 otč/min), 10 minut, sediment se zahodí.
- II. 5000 g (2200 otč/min, rychlostní nástavec), dvakrát 15 minut, supernatant se zahodí.
- III. Sediment se resuspenduje a odstředí při 20.000 g (4800 otč/min. rychlostní nástavec) 15 minut.

Čistota preparátu byla kontrolována pod fázovým kontrastem. Mitochondrie byly dvakrát promyty pufovaným fyziologickým roztokem (0,15 M NaCl + 0,02 M Tris pH 7,4), protože sacharóza interferuje s TBK. Koncentrace mitochondrií byla stanovena biuretovým reagens a finální suspenze upravena na koncentraci 10 mg bílkoviny v 1 ml. Do kyvety o průměru 25 mm byly odměřeny 4 ml mitochondriální suspenze a vzorek inkubován při 37° C za současného třepání. V intervalech 0,15, 30, 60, 120 a 180 minut byl odebrán vzorek suspenze mitochondrií a provedena reakce s TBK v tomto systému: 0,5 ml mitochondrií 0,5 ml ústoj (Tris 0,02 M pH 7,4 + 0,15 M NaCl), další postup stejný jako u jater.

STANOVENÍ BÍLKOVIN V MITOCHONDRÍÍCH

Potřeby: Biuretovo reagens (1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 6,0 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_5 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 500 ml vody, pak smíchá s 300 ml 10% NaOH a doplní na jeden litr roztoku), aceton: butanol 2 : 1, Tween 80.

Provedení reakce: 0,5 ml Tween 80 + 0,5 ml mitochondriální suspenze + 0,5 ml pufované sacharózy + 8,0 ml biuretova reagens. Systém byl ponechán 20 minut při teplotě místnosti, pak byly přidány 4 ml směsi butanol : aceton a proměřena absorpce při 540 m μ (spektrofotometr Zeiss VSU 1, flintové prizma, 1356 dílků monochromátoru); koncentrace mitochondrií byla pak vyjádřena v mg bílkoviny standardního vzorku hovězího albuminu. Stanovení reakce s TBK v játrech: 2,0 ml homogenátu jater 4,0 ml fosfátového ústoj, se inkubují 60 min. aerobně při 37° C, po té se přidají 2,0 ml TCK, 2,0 ml TBK, vše se povaří 10 min. na vřelé vodní lázni, ochladí, odstředí a proměří. Stanovení reakce s TBK v tenkém střevě: 3,0 ml homogenátu tenkého střeva, 3,0 ml fosfátové ústoj, dále postup zpracování stejný jako u jater. Inhibiční účinek tenkého střeva na reakci s TBK v játrech: 2,0 ml homogenátu jater, 1,0 ml homogenátu tenkého střeva, 3,0 ml fosfátového ústoj, dále postup stejný jako u reakce s TBK v játrech. Reakce s TBK byla kvantitativně stanovena na spektrofotometru CF 4 Optica, kyveta Helma HS 10 mm, 525 m μ . Statistické hodnocení bylo provedeno t-testem.

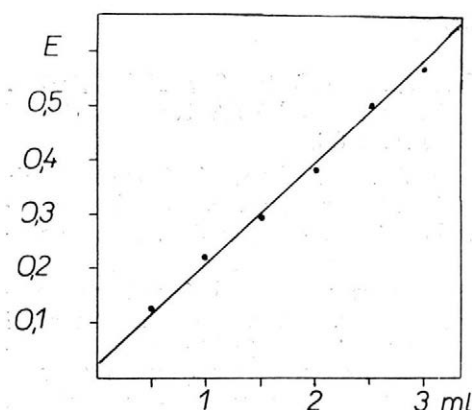
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V první části práce jsme sledovali tvorbu oxydačních produktů nenasyčených mastných kyselin v normálních játrech. Jaterní homogenát ve fosfátové ústoji pH 5,9, v ředění 1 : 50 dával po 60 min. inkubaci při 37° C výraznou barevnou reakci. Intenzita zabarvení je lineární v závislosti na koncentraci homogenátu jak je patrné z gr. 1. V dalším pokusu jsme sledovali tuto reakci v homogenátech tenkého střeva připraveného stejným způsobem jako jaterní tkáň. Již vizuálně se liší kvalita získaného barevného chromogenu. Provedli jsme proto spektrální rozbor vzniklého chromogenu. Absorpční křivka chromogenu z jater a tenkého střeva je uvedena na gr. 2. Spektrum vykazuje dvě zřetelná maxima při 462 a 535 nm a nevýrazné maximum před 535, projevující se jako inflexe v absorpční křivce. Chromogen ze střevní mukózy má podstatně nižší maximum 535 než chromogen z jater, tím vzrůstá relativní podíl maxima 462, což způsobuje změnu kvality barvy a viditelný posun do žlutavého tónu.

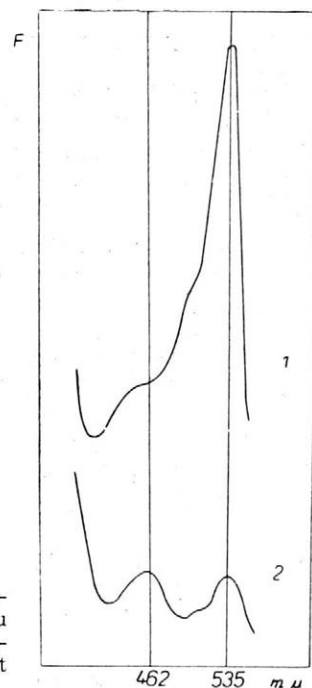
Jak známo, má střevní sliznice silné antioxydační vlastnosti, které blokují tvorbu reakci s TBK v játrech (12, 13). Prošetřili jsme proto koncentrační závislost této inhibice a výsledky jsou uvedeny na gr. 3. V uvažovaném rozmezí

do 1 ml homogenátu střevní mukózy přidané do jaterního homogenátu, je inhibice barevného produktu TBK reakce prakticky lineární. Vliv ionizujícího záření na tvorbu oxidačních produktů reakcí s TBK v játrech po celotělovém ozáření dávkou 1400 r je uveden v tabulce I. Po ozáření jsme nezjistili zvýšení hodnot TBK reakce v homogenátu jater. Pouze 6 hodin a 72 hodin po expozici naopak klesají hodnoty této reakce, a to v intervalu 72 hodin po expozici signifikantně.

V dalším pokusu jsme proto stanovili vliv záření na tvorbu oxidačních produktů nenasycených mastných kyselin v totálním homogenátu tenkého střeva. Výsledky jsou uvedeny na tabulce II. Reakce s TBK je řádově nižší než u jater



Gr. 1. Kalibrační křivka TBK chromogenu v závislosti na koncentraci jaterního homogenátu. (Systém: 0—3 ml jaterního homogenátu 1 : 50 ad 6 ml fosfátového ústroje pH 5,9 0,05 M).



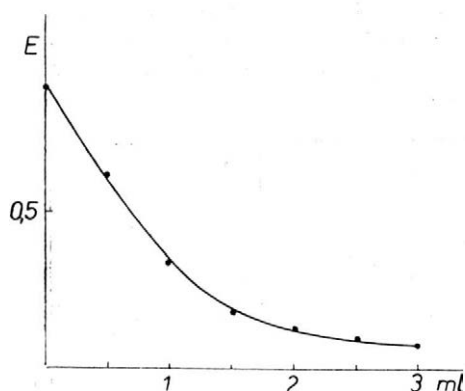
Gr. 2. Absorpční spektrum TBK chromogenu (1 — jaterní homogenát, 2 — homogenát tenkého střeva).

I. Vliv ionizujícího záření na hodnotu barevného produktu kyseliny 2-thiobarbiturové (TBK) v játrech krys ozářených celotělovou dávkou 1400 r.

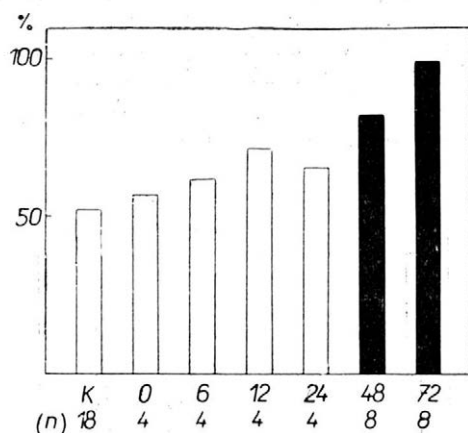
Doba po ozáření	Extinkce	n	P
Kontrola	1006 ± 158	32	—
0 hodin	1150 ± 91	4	—
6 hodin	892 ± 68	4	—
12 hodin	1087 ± 205	4	—
24 hodin	1005 ± 34	4	—
48 hodin	1048 ± 128	8	—
72 hodin	841 ± 132	7	0,05
n = počet krys P = pravděpodobnost významnosti			

II. Vliv ionizujícího záření na hodnotu barevného produktu kyseliny 2-thiobarbiturové (TBK) v tenkém střevě krys ozářených celotělovou dávkou 1400 r.

Doba po ozáření	Extinkce	n	P
Kontrola	85 ± 32	32	—
0 hodin	129 ± 24	4	—
6 hodin	91 ± 13	4	—
12 hodin	139 ± 23	4	0,01
24 hodin	85 ± 26	4	—
48 hodin	144 ± 45	8	0,01
72 hodin	60 ± 45	7	—
n = počet krys P = pravděpodobnost významnosti			



Gr. 3. Inhibiční účinek homogenátu tenkého střeva na tvorbu TBK chromogenu v játrech. (Systém: 3 ml jaterního homogenátu 1 : 50, 0 až 3 ml homogenátu tenkého střeva 1 : 30, ad 6 ml fosfátový ústoj pH 5,9, 0,05 M).



Gr. 4. Vliv ionizujícího záření *in vivo* v dávce 1400 r na inhibiční antioxydační kapacity tenkého střeva. (Černé sloupce = statistická významnost P 0,01, n = počet krys ve skupině).

a zaznamenali jsme zvýšení hodnot v čase 0, 12 a 48 hodin po dávce 1400 r. Protože hodnota TBK reakce je v tenkém střevě určována jednak koncentrací substrátu nenasyčených mastných kyselin, jednak obsahem antioxydačního faktoru, sledovali jsme dále vliv záření na obsah antioxydačního faktoru a na obsah antioxydační kapacity v tenkém střevě po celotělové dávce 1400 r. Výsledky jsou uvedeny na gr. 4. Po ozáření se antioxydační kapacita významně snižuje a v intervalu 48 a 72 hodin dosahuje cca nulové hodnoty. Záření tedy významně blokuje tuto antioxydační kapacitu. Protože inhibice se objevuje až v pozdějším intervalu po expozici, jde nejspíše o přímé poškození mitoticky aktivních buněk ionizujícím zářením.

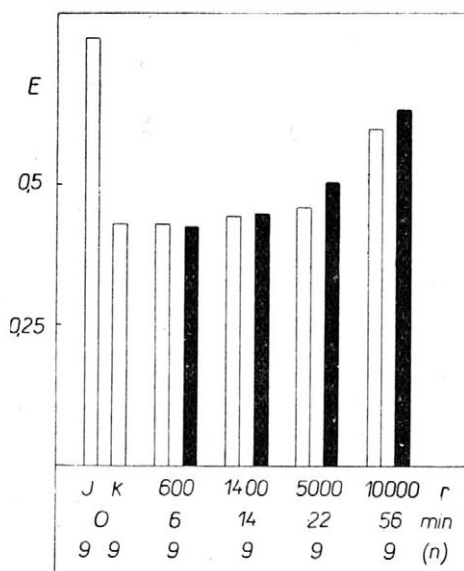
Sledovali jsme dále, zda tento antioxydační faktor není ovlivnitelný přímo *in vitro*. Ozářili jsme proto homogenát střevní sliznice ve fosfátovém ústojí pH 5,9 ředění 1 : 30 ve skleněné váze o obsahu 50 ml, která byla pomocí poly-

III. Vliv ionizujícího záření *in vitro* na hodnotu barevného produktu kyseliny 2-thio-barbiturové (TBK) v tenkém střevě krysy

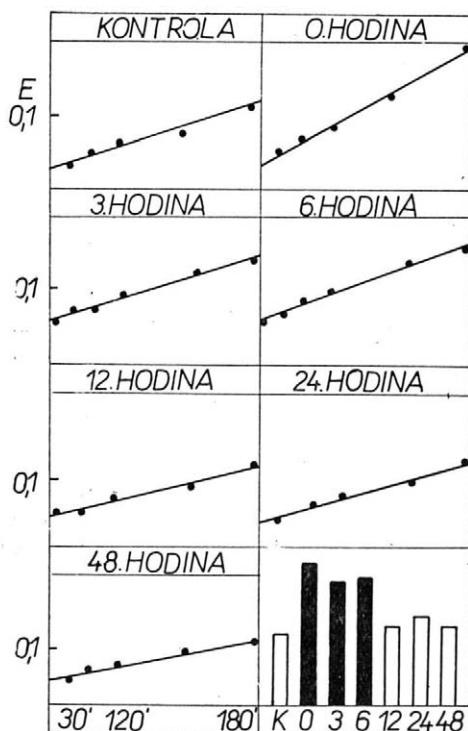
Dávka <i>in vitro</i>	Ozářené tenké střevo inkubace		Kontrolní tenké střevo inkubace		n
	0 minut	60 minut	0 minut	60 minut	
Kontrola	58 ± 7	70 ± 7	58 ± 7	70 ± 7	9
600 r	72 ± 7	76 ± 8	56 ± 5	67 ± 5	9
1400 r	69 ± 7	72 ± 6	63 ± 7	57 ± 4	9
5000 r	65 ± 9	64 ± 9	63 ± 8	54 ± 10	9
10.000 r	73 ± 12	86 ± 12	69 ± 11	74 ± 7	9

n = počet krysy

styrenového prstence upevněna na Dewarovu nádobu, temperovanou vodou 37° C teplou. Homogenát byl překryt celofánovou folií, aby se zamezilo vypařování. Kontrolní vzorek homogenátu střevní sliznice byl temperován na termostatu Wobser U 8 rovněž při 37° C. Homogenát byl ozářen dávkou 600, 1400, 5000 a 10 000 r (Makrophos 235 kV, 14 mA, 0,5 mm Cu, 1 mm Al příliv 100 r za minutu). Výsledky jsou uvedeny na tabulce III.



Gr. 5. Vliv ionizujícího záření *in vitro* na antioxydační kapacitu tenkého střeva. (Bílé sloupce inkubace střevního homogenátu při 37° C, černé sloupce = ozářený střevní homogenát, J = TBK chromogen v játrech, K = antioxydační kapacita tenkého střeva kontrolních krysy, n = počet zvířat ve skupině).



Gr. 6. Vliv ionizujícího záření na tvorbu TBK chromogenu v mitochondriích jater u krysy ozářené celotělovou dávkou 1400 r.

Po ozáření je pozorován trend k zvýšení hodnot TBK, který nedosahuje statistické významnosti. Srovnali jsme současně v tomto pokusu vliv ionizujícího záření na antioxydační kapacitu tenkého střeva ozářeného *in vitro*. Výsledek je uveden na gr. 5. Již inkubace při 37° C snižuje antioxydační účinek tenkého střeva, dávka 5000 r tento účinek zesiluje, ale není rozdíl mezi kontrolní inkubovanou a ozářenou tkání. Vzhledem k význačnému podílu lipidů v buněčných ultrastrukturách, považovali jsme za vhodné sledovat vliv pronikavého záření na jaterní mitochondrie, izolované z ozářených krys. Oxydační produkty lipidů byly stanoveny jednak bez inkubace, tj. ihned po ozáření, a dále po 15, 30, 60, 120 a 180 minutové inkubaci na inaktivační lázni při 37° C. Stejným způsobem byla hodnocena TBK reakce u kontrolních zvířat. U ozářených krys jsme zjistili významná zvýšení reakce s TBK. Zvýšení je maximální v intervalu těsně po ozáření, přetrvává statisticky zvýšené 3 až 6 hodin po expozici, a v dalších intervalech se vrací k normálním hodnotám. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na gr. 6.

DISKUSE

Neprokázali jsme bezprostřední vliv záření na zvýšení oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin v jaterních homogenátech krys ozářených celotělovou dávkou 1400 r. Nenalezli jsme v dostupné literatuře práci sledující vliv záření za obdobných technických podmínek uspořádání pokusu Lejssek (14) sice zjišťuje zvýšení TBK chromogenu v játrech krys ozářených dávkou 600 r, ale až třetí a šestý den po celotělovém ozáření. V této době se ovšem zvyšují lipidy v játrech a tím se zvyšuje současně koncentrace nenasycených mastných kyselin dávajících pozitivní TBK reakci. Nelze ovšem v žádném případě dokázat zvýšené množství oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin bezprostředně po ozáření jako přímý produkt radiochemického účinku záření. Z nálezu lze uzavřít, že ani po supraletální dávce 1400 r *in vivo* nedochází v časných intervalech po ozáření k zvýšenému výskytu oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin v játrech.

Mukóza tenkého střeva obsahuje na druhé straně antioxydační faktor, který snižuje tvorbu oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin za aerobní inkubace. Proto také i při dostatku substrátu nenasycených mastných kyselin je intenzita TBK reakce řádově nižší než u jaterního homogenátu. Ottolenghi a spol. (13) rozpracovali poznatky Barbera (12) o bližší povaze antioxydačního faktoru přítomného ve střevní mukóze. Tento antioxydační účinek vysvětlují uvolňováním mastných kyselin z fosfolipidů přítomných v mukóze tenkého střeva. Tyto mastné kyseliny vážou potom železo a jiné kovy, které katalyzují peroxydaci, a tím inhibují tvorbu oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin. Po ozáření se snižuje fosfolipázová aktivita a tím také antioxydační kapacita. Po ozáření dávkou 1400 r jsme prokázali dvoufázové, statisticky významné zvýšení oxydačních produktů, a to 12 a 48 hodin po ozáření. Naproti tomu ani dávka 10.000 r *in vitro* nevyvolala zvýšenou tvorbu oxydačních produktů v ozařovaném homogenátu. Antioxydační kapacita mukózy tenkého střeva hodnocená podle útlumu TBK reakce jater po přidání homogenátu tenkého střeva se snižuje během inkubace s časem. Účinek záření v dávce 5.000 a 10.000 r sice zvyšuje tuto inhibici, ale nevýznamně. Uvedená dávka záření tedy neporuší významně antioxydační kapacitu mukózy střeva a výsledky odpovídají vcelku radiorezistenci uvažovaných lipáz. Naproti tomu se významně snižuje antioxydační kapacita tenkého střeva po ozáření *in vivo*. Signifikantní sní-

žení, které odpovídá prakticky totální inhibici antioxydační kapacity jsme pozorovali 48 hodin a 72 hodin po dávce 1400 r. Protože inhibice narůstá v časovém průběhu nemoci z ozáření, je sekundárního charakteru. V tenkém střevě jsou radiosenzitivní buňky Lieberkühnových krypt, které jsou ozářením specificky poškozovány. Délka generačního cyklu těchto buněk činí 19 hodin (15) a jejich biologický poločas odpovídá době tzv. 3½denní intestinální smrti pozorované po dávkách vyšších než LD 100. Dochází zde k totální zástavě mitóz v těchto buňkách. Biologický poločas těchto buněk dobře souhlasí s dobou pozorované inhibice antioxydační kapacity ozářeného tenkého střeva. Tedy ani v tomto případě není porucha inhibice antioxydační kapacity primární změnou vyvolanou zářením, ale vzniká teprve během radiačního poškození. Zdá se, že antioxydační kapacita je spojena s mitotickou činností buněk a objevuje se u buněk se synchronizovaným buněčným cyklem až ve stadiu mitóz (11).

Jaterní mitochondrie obsahují vysoký podíl lipidů, které vytvářejí TBK reakci. Lejsek (16) neprokázal po ozáření *in vitro* zvýšenou tvorbu oxydačních produktů hodnotitelných reakcí s TBK. Po dávce 1400 r se zvyšuje množství TBK chromogenu jak před inkubací tak po aerobní inkubaci. Zvýšení je krátkodobé a dosahuje maximum ihned po ozáření a normalizuje se do 12 hodin po ozáření. Krátkodobé zvýšení TBK odpovídá krátkodobému zvýšení obsahu nenasycených mastných kyselin v ozářených mitochondriích (17). V pozdějších intervalech již není pozorováno zvýšení TBK reakce v mitochondriích, což odpovídá krátkodobým změnám v mitochondriích po ozáření (18).

SOUHRN

Byl sledován vliv záření na tvorbu oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin pomocí reakce s kyselinou 2-thiobarbiturovou (dále TBK). Po celotělové dávce 1400 r se nezvyšuje obsah oxydačních produktů v játrech ozářených krys. V tenkém střevě je TBK reakce u normálních krys řádově nižší než v játrech a po dávce 1400 r se TBK látky dvoufázově zvyšují, a to 12 a 48 hodin po ozáření. Antioxydační kapacita tenkého střeva je 48 hodin po celotělovém ozáření významně blokována po dávce 1400 r *in vivo*. Po ozáření *in vitro* až dávkou 10.000 r nedochází k významné inhibici antioxydační kapacity. V mitochondriích izolovaných z jater krys ozářených celotělovou dávkou 1400 r se významně zvyšuje množství oxydačních produktů nenasycených mastných kyselin, a to ihned po ozáření a přetrvává 6 hodin po expozici.

Došlo dne 3. 5. 1965

Literatura

1. Les peroxydes organiques en radiobiologie, vydal M. Haissiski, Masson, Paris, 1958. — 2. Rol perekiseji kisloroda v načalnych stadijah radiobiologičeskogo efekta IAN SSSR, Moskva 1960. — 3. Peroxides in Radiobiology, A Symposium. Rad. Res., suppl. 3, 1963. — 4. Gilbert, D. L.: Rad. Res., suppl. 3, (1963), 44. — 5. Green, D. K.: v Ciba Foundation Symposium on quinones in electron transport, vydal G. E. W. Wolsteinholme a C. M. O. Connor, Churchill Ltd., 1961, str. 130. — 6. Philpott, J. S. T. L.: Rad. Res., suppl. 3, (1963), 55. — 7. Kohn, H. I., Liversedge, N. J.: Pharmacol. Exp. Therapeut., 82, (1944), 292. — 8. Bernheim, F., Barber, A. A., Ottolenghi, A., Wilbur, K. M.: Rad. Res., 9, (1958), 91. — 9. Bernheim, F.: Rad. Res., suppl. 3, (1963), 17. — 10. Placer, Z., Slabochová, Z.: Čsl. fyziologie, 9, (1960), 562. — 11. Zícha, B., Lejsek

sek, K., Šimek, J., Beneš, J., Pospíšil, M., Dienstbier, Z.: Čsl. fysiologie, v tisku. — 12. Barber, A. A., Wilbur, K. M.: Rad. Res., 10, (1959), 167. — 13. Ottolenghi, A., Bernheim, F.: Rad. Res., 12, (1960), 371. — 14. Lejsek, K.: Čsl. fysiologie, 12, (1963), 67. — 15. Sherman, F. G., Quastler, H.: Expt. Cell Research 19, (1960), 343. — 16. Lejsek, K.: Čsl. fysiologie, 11, (1962), 139. — 17. Schwarz, H. P., Drebach, L., Barrionuveb, M., Kleschick, A., Kostyk, I.: Arch. Bioche, Biophys. 92 : (1961), 133. — 18. Lejsek, K.: Čsl. fysiologie 11, (1962), 543.

Окислительные продукты ненасыщенных жирных кислот в облученном организме

Изучалось влияние облучения на образование окислительных продуктов ненасыщенных жирных кислот при помощи реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (далее ТВК). После облучения дозой 1400 р содержание окислительных продуктов в печени облученных крыс не увеличивается. В тонкой кишке ТВК реакция у нормальных крыс, обыкновенно, ниже, чем в печени и после дозы 1400 р ТВК вещества двухфазно увеличиваются, а именно через 12 и 48 часов после облучения. Антиокислительная емкость тонкой кишки в течение 48 часов после облучения значительно заблокирована после дозы 1400 р *in vivo*. После облучения *in vitro* дозой вплоть до 10 000 р значительный ингибции антиокислительной емкости не наблюдается. В митохондриях, изолированных из печени крыс, облученных по всему телу дозой 1400 р, значительно увеличивается количество окислительных продуктов ненасыщенных жирных кислот, а именно сразу же после облучения и продолжается 6 часов после экспозиции.

Oxydation-Products of Unsaturated Fatty Acids in Irradiated Organism

The influence of radiation on the creating of oxydation-products of unsaturated fatty acids was followed by means of reaction with 2-barbituric acid (further TBA). The contents of oxydation-products does not increase in liver of irradiated rats after a whole-body irradiation. The TBA-reaction in the small intestine of normal rats is lower by order than that in liver and after a dose of 1400 r the TBA-substances increase in two phases (after 12 and 48 hours following the irradiation). Antioxydation-capacity of the small intestine is significantly blocked for 48 hours after a whole-body irradiation in the dose of 1400 r *in vitro*. No significant inhibition of antioxydation-capacity arises after the *in vitro* irradiation with a dose reaching 10 000 r. The amount of oxydation-products of unsaturated fatty acids rises significantly in mitochondriae isolated from liver of the rats irradiated with a whole-body dose of 1400 r. This phenomenon appears immediately after irradiation and outlasts for 6 hours after the exposure.

Die Oxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren im bestrahlten Organismus

Wir verfolgen den Einfluß der Bestrahlung auf die Bildung von Oxydationsprodukten der Fettsäuren mittels der Reaktion mit der 2-Thiobarbitursäure (weiter nur TBS). Nach Ganzkörperbestrahlung mit 1400 r erfährt der Gehalt der Leber an Oxydationsprodukten bei bestrahlten Ratten keine Steigerung. Im Dünndarm ist die TBS-Reaktion bei normalen Ratten erheblich schwächer als in der Leber und nach einer Dosis von 1400 r steigen die TBS-Stoffe in zwei Phasen an, und zwar 12 und 48 Stunden nach der Bestrahlung. Die Antioxydationskapazität des Dünndarmes ist 48 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung mit 1400 r *in vivo* erheblich

blockiert. Nach Bestrahlung in vitro bis zu 10 000 r tritt keine bemerkenswerte Inhibition der Antioxydationskapazität auf. In den aus der Leber mit 1400 r ganzkörperbestrahlter Ratten isolierten Mitochondrien steigt die Menge der Oxydationsprodukte der ungesättigten Fettsäuren signifikant an, und zwar gleich nach der Bestrahlung und die Steigerung dauert bis 6 Stunden nach der Exposition.

MVDr. Blahoslav Zícha

MVDr. Jiří Beněš

Veterinární výzkumné středisko,
Praha - Motol

■ O svalových larvách *Trichinella spiralis* je obecně uznáván názor, který formuloval Sta ub li 1909 (8), že od doby, kdy je hostitelská tkáň obklopí pouzdrem, žijí ve stadiu latence. Larvy v něm nerostou a nevyvíjejí se, žijí však v něm po léta i desetiletí a jsou schopny pohybu uvnitř pouzdra. Je tedy více než pravděpodobné, že nevystačí ani v období latence se zásobními látkami ve svém těle, nýbrž že jsou závislé na přívodu živin z tkání hostitele. Svědčí pro to i práce, v níž Sta n n a r d & spol. 1938 (7) prokázali miktorespirometrickými metodami, že svalové larvy *T. spiralis* disponují jak aerobním, tak anaerobním metabolismem. S t o n e r & H a n k e s 1955 (9) dokonce ukázali v pokusech s některými aminokyselinami značenými C 14, že larvy inkorporují tyto látky nejen v době své migrace, nýbrž i ve zralém, dlouho encystovaném stadiu. M c C o y & spol. 1941 (2) použili poprvé radioaktivního fosforu ke studiu permeability pouzdra, obklopujícího svalovou larvu *T. spiralis*. Porovnáním specifické aktivity P 32 v izolovaných larvách se specifickou aktivitou P 32 ve stejně zpracované svalovině krys došli k závěru, že fosfor prostupuje stěnou cysty a proniká do larev. Nemohli rozhodnout, zda jde o prostou difúzi sledované látky, či o aktivní vestavbu fosforu do těla larev; podle rychlosti procesu však považují druhou alternativu za pravděpodobnější.

V orientačním pokuse, o němž zde referujeme, jsme navázali na jejich práci. Při studiu metabolismu cukrů v larvách *T. spiralis* jsme totiž pozorovali vysoce pozitivní reakci orcinem na ribózu a difenylaminem na desoxyribózu. Značná koncentrace těchto pentóz nás vedla k předpokladu, že fosfor, jehož pronikání do larev *T. spiralis* M c C o y & spol. 1941 (2) pozorovali, bude možno prokázat v nukleových kyselinách.

MATERIÁL A METODIKA

Pracovali jsme s 5 morčaty, která byla 4 měsíce předem invadována 5000 až 6000 larvami *Trichinella spiralis*. Radioaktivní fosfor ve formě Na_2HPO_4 byl podán orálně o aktivitě 137 μC . Po 4 dnech byla morčata zabita a jejich svalovina zpracována běžnou trávící metodou. Z každého morčete bylo získáno kolem 500.000 svalových larev, které byly po promytí fyziologickým roztokem NaCl zhomogenizovány v jemném skleněném homogenizátoru. Homogenát byl podroben částečně hydrolýze podle S c h n e i d e r a 1945 (6). Z postupně

získávaných frakcí byly pyknometrem odebírány vzorky, vysušeny pod infračervenou lampou, zváženy a proměřena jejich aktivita. Měřili jsme na čítači Vakutronik s Geiger-Müllerovou trubicí při napětí 1500 V; každý vzorek byl měřen po dobu 5 minut. V konečném produktu částečné hydrolyzy, tj. v kyselém výluhu nukleových kyselin, byla před měřením aktivity prokázána ribóza a desoxyribóza.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Aktivita frakcí, postupně získávaných při hydrolyzaci, byla — s výjimkou směsné frakce RNK a DNK — v rámci naměřeného pozadí. Průměrné hodnoty zjištěné ve výchozím materiálu, tj. v homogenátu ze svalových larev *T. spiralis*, a v konečném produktu hydrolyzy, tj. ve směsi RNK a DNK, jsou patrné z tabulek I a II.

I. Aktivita P 32 v homogenátu z larev *T. spiralis*

Vzorek č.	Váha/g	Imp./5 min.	Pozadí/5 min.
1	0,0190	186	114
2	0,0172	175	125
3	0,0172	167	104
4	0,0192	194	125
5	0,0184	168	106
Průměr	0,0182	178	115

II. Aktivita P 32 ve směsi RNK a DNK z larev *T. spiralis*

Vzorek č.	Váha/g	Imp./5 min.	Pozadí/5 min.
1	0,0170	192	120
2	0,0164	180	114
3	0,0165	190	116
4	0,0160	195	118
5	0,0156	178	108
Průměr	0,0163	187	115

Aktivita našich vzorků, vyjádřená v impulsech za 1 minutu, je po odpočtu pozadí u homogenátu průměrně 12,6, u směsi RNK a DNK průměrně 14,4. Průkaznost aktivity vzorků ve srovnání s hodnotami pozadí byla ověřena Studentovým t-testem; je statisticky vysoce významná: $P < 0,001$.

$$t = \frac{178 - 115}{\sqrt{27,6 + 20}} = \frac{63}{\sqrt{47,6}} = \frac{63}{6,9} = 9,1304.$$

Jiný test, který respektuje i dobu měření, je uveden u Petrové a kol. 1960 (5). Podle něj je

$$[u] = \frac{\frac{178}{5} - \frac{115}{5}}{\sqrt{\frac{178}{25} + \frac{115}{25}}} = \frac{35,3 - 23,0}{\sqrt{11,72}} = \frac{12,3}{3,42} = 3,6.$$

Naše hodnota $[u]$ je tedy větší než h , která je podle tabulky 3,2905 pro spolehlivost 99,9 %. Je tedy zřejmé, že naše vzorky byly signifikantně aktivní.

Pro porovnání aktivit, naměřených ve vzorcích homogenátu larev a ve vzorcích směsi nukleových kyselin z nich lze v nomogramu podle Aronoffa 1956 (1) odečíst při střední četnosti 15 impulsů za minutu při pětiminutovém měření relativní chybu 3 impulsy za minutu při 90 % spolehlivosti. V našem případě tedy mají vzorky homogenátu i vzorky směsi RNK a DNK při prakticky stejné návážce stejnou aktivitu v mezích pozorovacích chyb: $12,6 \pm 3$ a $14,4 \pm 3$ impulsy za minutu. Při našich návážkách a četnostech signálu je při 99,9 % spolehlivosti patrné, že P 32, inkorporovaný do larev, je obsažen v nukleových kyselinách. Při prostupu fosforu z organismu hostitele do svalových larev *T. spiralis* nejde tedy zřejmě o jev osmotický nebo koncentrační, nýbrž o aktivní inkorporační proces.

Vazba fosforu na nukleové kyseliny a vysoce pozitivní barevné reakce na pentózy naznačují — připomeneme-li si ještě klasické práce o purinu při trichinelóze, které uveřejnil Flury 1913 (3) a Flury a Groll 1913 (4) — že i v opouzdřených svalových larvách *Trichinella spiralis* živě probíhají metabolické děje. Jejich podrobné studium bude předmětem našich dalších prací.

SOUHRN

Trichinelózním morčatům byl orálně aplikován P 32. Izolované larvy *Trichinella spiralis* byly homogenizovány a podrobeny částečné hydrolýze podle Schneidera 1945 (6). Geiger-Müllerovou trubicí byla stanovena radioaktivita získaných frakcí.

Výsledek tohoto orientačního pokusu ukazuje, že P 32 je vestavěn do nukleových kyselin, což svědčí o jeho aktivní inkorporaci do těla larev a o jeho účasti na metabolických procesech těchto parazitických organismů.

Došlo dne 3. 5. 1965

Literatura

1. Aronoff S (1956): Techniques of Radiobiochemistry, Ames, Yowa.
2. McCoy, O. R., Downing, V. F., Voorhis, S. N. (1941): The Penetration of Radioactive Phosphorus into encysted *Trichinella* larvae. J. Parasit. 27 : 53-58.
3. Flury, F. (1913): Beiträge zur Chemie und Toxikologie der Trichinen. Arch. exp. Path. Pharmak. 73 : 164-213.
4. Flury, F., Groll, H. (1913): Stoffwechseluntersuchungen an trichinösen Tieren. Arch. exp. Path. Pharm. 73 : 214-232.
5. Petrová, J. a kol. (1960): Radioisotopy v biologii a lékařství. Praha.
6. Schneider, W. (1945): Phosphorus Compounds in Animal Tissues. J. Biol. Chem. 161 : 293-303.
7. Stannard, J. N., McCoy, O. R., Latchford, W. B. (1938): Studies on the metabolism of *Trichinella spiralis* larvae. Am. J. Hyg. 27 : 666-682.
8. Staubli, C. (1909): Trichinosis. Wiesbaden.
9. Stoner, R. D., Hankes, L. V. (1955): The Use of Radioactively Labelled Compounds in Study of Metabolic Inter-relationships of Host and Parasitic Helminths. Proc. Intern. Conf. Genève 10 : 529.

Поступление Р 32 в личинки трихин *Trichinella spiralis*

Трихинозным морским свинкам подавался через рот Р 32. Изолированные личинки *Trichinella spiralis* были гомогенизированы и подвергнуты частичному гидролизу по Шнейдеру 1945/6. При помощи трубки Гейгера-Мюллера определялась радиоактивность полученных фракций.

Результат этого ориентировочного опыта показывает, что Р 32 входит в нуклеиновые кислоты, что свидетельствует о его активном поступлении в тело личинок и о его участии в метаболических процессах этих паразитических организмов.

On Incorporation of P 32 into Muscle-Stage Larvae of *Trichinella spiralis*

P 32 was applied per os to guinea pigs suffering from experimental trichinellosis. Isolated larvae of *Trichinella spiralis* were homogenized and partially hydrolyzed according to Schneider 1945(6). The radioactivity of the obtained fractions was determined by means of a Geiger-Müller tube.

The result of this orientation experiment shows P 32 being incorporated into nucleic acids which proves its active incorporation into the bodies of the larvae and its taking part in the metabolic processes of these parasitic organism.

Zur Inkorporation von P 32 in Muskellarven von *Trichinella spiralis*

Trichinellösen Meerschweinchen wurde P 32 oral einverleibt. Isolierte Larven *Trichinella spiralis* wurden homogenisiert und einer teilweisen Hydrolyse unterworfen. Die Radioaktivität der gewonnenen Fraktionen (nach Schneider 1945(6)) wurde mittels eines Geiger-Müller-Zählrohres gemessen.

Das Ergebnis dieses orientierenden Versuches zeigt, daß P 32 in den Nukleinsäuren eingebaut ist, was für seine aktive Inkorporation in den Larvenkörper und für seinen Anteil an den metabolischen Prozessen dieser parasitären Organismen spricht.

MVDr. Hubert Schanzel CSc.

RNDr. Oldřich Synek

Vysoká škola zemědělská, veterinární
fakulta, katedra lékařské chemie, fyziky
a toxikologie, Brno, Palackého 1-3

I. STANOVENIE AUTOPROTEOLYTICKEJ AKTIVITY
HOVÁDZIEHO SÉRA V KYSLEJ OBLASTI pH

■ Stanovenie enzymatickej aktivity patrí k tým oblastiam biochémie, ktoré využívajú zatiaľ v dostatočnej miere výhody použitia rádioizotopov. Jednou zo závažných príčin sa zdá byť skutočnosť, že pri použití izotopov je nutné oddelenie produktu enzymatickej reakcie od substrátu, čím sa celý postup stáva pomalší a pracnejší. Táto nevýhoda prakticky odpadá v prípade enzýmov proteolytických, kde je proces oddelenia pomocou zrážania ľahký a rýchly; zostáva len zvoliť vhodný spôsob rádioaktívneho označenia bielkoviny. Aby výsledky boli úplne vierohodné, musel by byť splnený požiadavek totožnosti značených a neznačených molekúl; najlepšie priblíženie by sa dosiahlo napr. inkorporáciou ^{14}C — značených aminokyselín do bielkoviny *in vivo*. Tento postup by bol príliš náročný a zdĺhavý a naviac meranie aktivity ^{14}C s dostatočnou účinnosťou vyžaduje špeciálne zariadenie. Preto sa bežne používa ako substrát bielkovina (hlavne albumín) značená izotopom ^{131}I . V prípade enzýmov malej špecifičnosti môžeme predpokladať, že chemické odlišnosti jednotlivých molekúl (jódovaných a nejódovaných) neovplyvnia význačne rýchlosť, s akou dochádza k ich rozštiepeniu, t. j. aktivačnú energiu hydrolýzy peptidických väzieb. Použitie takto označeného substrátu pri určovaní aktivity enzýmov štiepiacich bielkoviny poskytuje jednoduché, rýchle a citlivé metodiky, vhodné pre sériové stanovenie s možnosťou využitia automatických prístrojov.

LITERÁRNY PREHLAD

V literatúre bolo popísané stanovenie aktivity niektorých proteáz pomocou bielkovinných substrátov značených ^{131}I (albumín, fibrinogén), napríklad: plazmín a trypsin v plazme (1), pepsín v žalúdočnej šťave (2), uropepsín (3).

Pre stanovenie proteolytickej aktivity séra pri pH 1,5–1,7 existuje niekoľko postupov, založených jednak na fotometrickom stanovení bielkovinných štepov po deproteinizácii inkubovanej zmesi substrátu s enzýmom, jednak na stanovení polarografickom. Klasické metódy fotometrické používali ako substrát hemoglobín (4), (5); vhodnosť tohto substrátu bola kriticky zhodnotená v práci J. Koláča a spol. (6), ktorí navrhli presnú metódu autoproteolytickú a porovnali ju s metódou polarografickou S. Janouška (7), založenou tiež na autoproteolyze séra. Túto polarografickú metódu upravil tiež J. Homolka (8). Pri našej práci sme vychádzali hlavne z citovaných metód pre polarografické stanovenie.

Stanovením proteolytickej aktivity ľudského séra pri pH 3,75 zaoberali sa S. Janoušek (9) a J. Homolka (10), (11). Zistili, že týmto stanovením možno nahradiť experimentálne náročnejšie stanovenie transamináz, ktoré sa používa ako enzymatický test pri diagnostike infekčnej hepatitídy v humánnej medicíne. Používali metódu založenú na polarografickom stanovení bielkovinných štepov, ktoré sa nezrážajú kyselinou sulfosalicylovou. Táto metóda sa ukázala dostatočne presná a citlivá. V našom laboratóriu sme vychádzali z postupu navrhnutého J. Homolkom (11), ktorý sme upravili tak, aby bolo možné stanoviť katepsín v sére z rýchlosti autoproteolýzy pri pH 3,7–3,9 meranej pomocou sérum-albumínu označeného rádioaktívnym jódom (RISA). Katepsínom rozumíme, rovnako ako citovaní autori, enzymatický systém v pôvodnom širokom pojatí Willstättera a Baumanna, zahrňujúci aspoň 6 rôznych proteáz, ktoré však nie sú všetky rovnako aktívne v danom rozmedzí pH. Je treba mať na zreteli, že v tomto rozmedzí pH sa ešte uplatňuje aj aktivita pepsínu; tento vplyv môže byť značný tam, kde je obsah pepsínu v sére dosť vysoký.

V dostupnej literatúre nestretli sme sa so systematickým určovaním proteolytickej aktivity sér hospodárskych zvierat a preto naša pozornosť je zameraná na riešenie tejto problematiky. Kvôli porovnaniu s aktivitou humánnych sér previedli sme aj polarografické analýzy.

MATERIÁL A METODIKA

Používané chemikálie boli všetky čistoty p. a. s výminkou kyseliny sulfosalicylovej čistoty puriss.

ROZTOKY

1. 0,5 n HCl
2. Glycinový pufer pH 1,6. (190 ml 0,1 M glycínu plus 310 ml 0,1 M HCl)
3. Citrátfosfátový pufer pH 3,6 (zloženie: 67 dielov 0,1 M kyseliny citrónovej plus 33 dielov 0,2 M Na_2PHO_4)
4. Sérumalbumín značený ^{131}I (v ďalšom označovaný anglickou skratkou RISA — radioiodinated serum albumin), špecifická aktivita asi $1 \mu\text{Ci}/0,1 \text{ ml}$, výroba NDR distribúcia ÚVVVR Praha
5. 20 %-ná kyselina sulfosalicylová
6. Brdičkova Co^{III} — solúcia.

Vzorky séra boli získané od klinicky zdravých kráv a uchovávané v chladničke pri 4°C nie viac než týždeň po odbere krvi.

PRÍSTROJE

Aktivitu gama žiarenia vzoriek sme merali pomocou smerovej scintilačnej sondy se studnicovým kryštálom NaI/Tl v spojení s počítačom NZQ 615 (výroba Tesla Přemyslení). Polarografické krivky boli zaznamenávané na polarografe LP-55 systém Heyrovský (Zbrojovka Brno). Konštanta galvanometra: $2,8 \cdot 10^{-9} \text{ A/mm/m}$. Použitá bola Kalouskova polarografická nádobka s nasýtenou kalomelovou elektródou. Konštanty kapiláry: $m = 1,869 \text{ mg s}^{-1}$, $t = 4,35 \text{ sec}$. pri výške rezervoára $h = 50 \text{ cm}$, merané pri zapojení nakrátko v 10^{-3} M KCl . pH inkubačných zmesí bolo spočiatku kontrolované elektrónkovým pH-metrom LP-58 sovietskej výroby.

PRACOVNÉ POSTUPY

1. MERANIE PROTEOLYTICKEJ AKTIVITY PRI pH 1,5—1,7 A PRÍPRAVA POLAROGRAFICKÉHO STANOVENIA

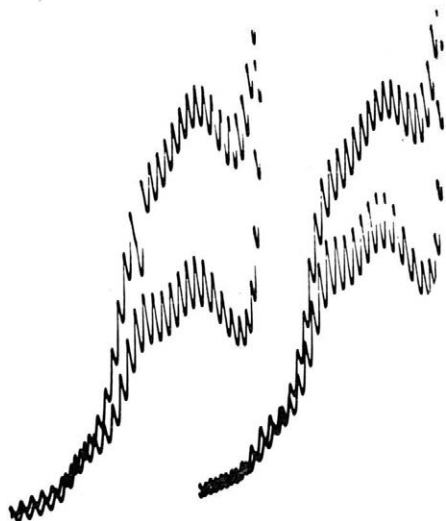
1,5 ml séra sa zmieša s 0,5 ml HCl, 0,1 ml RISA a doplní pufrum na 5,5 ml. Zo zmesi sa vezmú 2 ml na inkubáciu pri 37° C do termostatu a ďalšie 2 ml sa odpipetujú ako kontrolný podiel, ktorý zrazíme pridaním 2 ml kyseliny sulfosalicylovej; po 10 min. filtrujeme filtrom Schleicher—Schüll 602 h a filtrát uchováame v chladničke, rovnako ako zvyšok zmesi. V inkubovanom podiele zastavíme proteolýzu po 24 hodinách prídavkom 2 ml kyseliny sulfosalicylovej. Filtruujeme rovnako ako v prípade kontrolného podielu. Pre meranie aktivity pipetujeme do dvoch rovnakých nádobiek (objem 5 ml) po 1 ml kontrolného a inkubovaného filtrátu, do tretej nádoby 0,5 ml zmesi a 0,5 ml vody (kvôli rovnakej geometrii merania). Aktivitu všetkých vzoriek meriame v čo najmenšom časovom odstupe vzhľadom na pomerne krátky poločas ^{131}I .

Na polarografické stanovenie zmiešame 0,5 ml filtrátu s 2,5 ml kobaltitej solúcie a registrujeme vlnu pri vhodnej citlivosti (1 : 200) bez odstánenia kyslíka od -1000 mV. Ukážka polarogramu je na obr. 1a.

Obr. 1a. Polarografické stanovenie auto-proteolytickej aktivity pepsínu v hovädzom sére.

Spodné krivky: 0,5 ml sulfosalicylového filtrátu neinkubovaného podielu + 2,5 ml CoIII-solúcie.

Vrcholné krivky: 0,5 ml sulfosalicylového filtrátu inkubovaného podielu + 2,5 ml CoIII-solúcie.

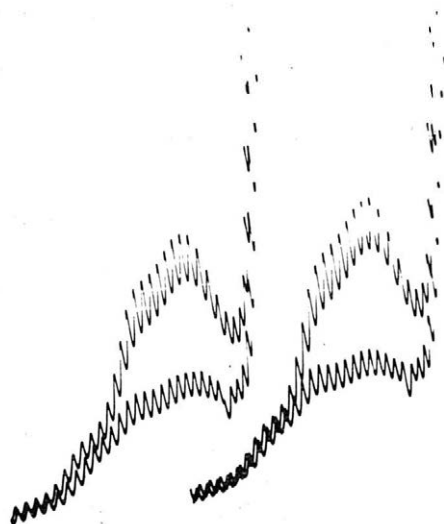


2. MERANIE PROTEOLYTICKEJ AKTIVITY PRI pH 3,7—3,9 A PRÍPRAVA POLAROGRAFICKÉHO STANOVENIA

0,6 ml séra sa zmieša s 0,1 ml RISA a 6,4 ml pufru. Z tejto zmesi 2 ml zrazíme hneď prídavkom 2 ml kyseliny sulfosalicylovej a ďalšie 2 ml dáme inkubovať v skúmavke do termostatu pri 37° C. Kontrolný podiel 10 min. po zrážaní filtrujeme vhodným filtrom (napr. Schleicher—Schüll 602 h) a filtrát necháme v chladničke spolu so zvyškom zmesi. Inkubáciu ukončíme po 24 hodinách pridaním 2 ml kyseliny sulfosalicylovej a opäť po 10 min. filtrujeme. Na meranie aktivity odmeriame 1 ml kontrolného filtrátu, 1 ml inkubovaného filtrátu a 0,5 ml zmesi + 0,5 ml vody do 5 - mililitrových lekárnických ampuliek. Meranie potom prevádzame v pokiaľ možno v malom časovom intervale, rozhodne

v priebehu jedného dňa, aby sme sa vyhli nutnosti prepočítavania aktivity na nulový čas.

K polarografickému stanoveniu berieme 0,5 ml filtrátu (kontrolného, resp. inkubovaného) a premiešame s 2,5 ml kobaltickej solúcie. Vlnu zaznamenávame pri vhodnej citlivosti od -1000 mV bez odstránenia kyslíka. Ukážka polarogramu je na obr. 1b.



Obr. 1b. Polarografické stanovenie aktivity katepsínu v hovädzom sére.

Spodné krivky: 0,5 ml sulfosalicylového filtrátu neinkubovaného podielu +2,5 ml Co^{III} -solúcie.

Vrcholné krivky: 0,5 ml sulfosalicylového filtrátu inkubovaného podielu +2,5 ml Co^{III} -solúcie.

Začiatok kriviek pri -1000 mV, citlivosť 1 : 200.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

1. AKTIVITA PRI pH 1,5–1,7

Na základe merania aktivity vyhodnotíme proteolytickú aktivitu séra nasledovným spôsobom: Označíme:

$N_{\text{kimp/min. ml}}$	.	.	.	.	.	.	.	aktivita kontrolného filtrátu
$N_{\text{iimp/min. ml}}$	.	.	.	.	.	.	.	aktivita inkubovaného filtrátu
$N_{\text{zimp/min. 0,5 ml}}$	.	.	.	.	.	.	.	aktivita zmesi

Percento P aktivity uvoľnenej z väzby na bielkovinu vypočítame zo vzorca

$$P = 100 \cdot \frac{4(N_i - N_k)}{4N_z - 4N_k} = 100 \cdot \frac{N_i - N_k}{N_z - N_k}$$

Ak prijmeme predpoklad, že pepsín rozkladá rovnako rýchlo značený albumín ako neznačený a približne rovnako aj globulíny, môžeme takto vypočítanú hodnotu P stotožniť s percentom celkovej bielkoviny séra, rozloženej autoproteolýzou na štepy, ktoré prechádzajú do sulfosalicylového filtrátu. Keď sérum obsahuje b grampercent bielkovinného dusíka, potom celkové množstvo dusíka uvoľneného z bielkoviny do štepov v 2 ml inkubačnej zmesi je

$$p = \frac{1,5 \cdot b}{100} \cdot \frac{P}{100} \cdot \frac{2}{5,5} = 5,45 \cdot 10^{-5} \cdot b \text{ P gramov}$$

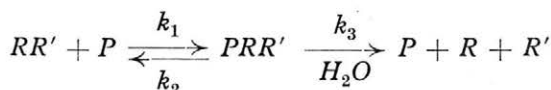
Chyba navrhovanej metódy pri hodnotách autoproteolytickej aktivity blízkych normálnym hodnotám v hovädzom sére, udaná štandardnou odchylkou, je menšia než $\pm 10\%$ stanovovanej hodnoty. Zdrojom ďalšej chyby je použitie RISA

z rôznych šarží. Z práce D. W. P i p e r a (2) vyplýva, že táto chyba, dana štandardnou odchylkou, môže dosiahnuť okolo $\pm 20\%$ stanovovanej hodnoty. Túto chybu možno odstrániť tým, že používaný roztok RISA kalibrujeme so štandardným roztokom pepsínu (ako substrát môžeme použiť napr. inaktivované sérum), alebo porovnaním výsledkov s výsledkami získanými inou metódou.

U 20 klinicky zdravých kusov hovädzieho dobytká sme stanovili priemernú hodnotu autoproteolytickej aktivity $5,78 \pm 1,82\%$ bielkoviny rozloženej za 24 hod. pri 37°C v zmesi obsahujúcej 1,5 ml séra v 5,5 ml roztoku, pH 1,5 až 1,7. Túto hodnotu môžeme vyjadriť tiež iným spôsobom. Vychádzame z priemerného zloženia sérových bielkovín: 44,9 % albumínov (mol. váha 69 000, počet aminokyselinových zbytkov v molekule 599, z toho 19 zbytkov tyrozínu), 29,1 % gama-globulínu (mol. váha 156 000, počet aminokyselinových zbytkov $841,3/10^5$ gramov, z toho $37,6/10^5$ g zbytkov tyrozínu). Priemerný obsah celkovej bielkoviny v sére berieme 6,5 g % (stanovené kjeldahlizáciou) a zanedbáme odlišnosti v zložení bielkovinej časti molekúl alfa- a beta-globulínov. Stredná hodnota autoproteolytickej aktivity je potom daná približne číslom 1,2 mEkv tyrozínu uvoľnených v zmesi obsahujúcej 1000 ml séra počas 24hodinovej inkubácie pri pH 1,5–1,7 a 37°C . Výsledok je v dobrej zhode so stanoveniami fotometrickými, prevedenými metódou J. K o l á ř a a spol. (6), podľa ktorých sa autoproteolytická aktivita pri pH 1,6 v hovädzom sére pohybuje okolo 1,2 mEkv (tieto stanovenia boli prevedené v našom laboratóriu a budú uverejnené pozdejšie). J. K o l á ř udáva pre ľudské sérum (za rovnakých podmienok) hodnotu 0,86 mEkv tyrozínu.

Orientačne bola sledovaná závislosť rýchlosti proteolýzy na znižovaní obsahu séra v inkubačnej zmesi (pri zachovaní konštantného objemu zmesi). Z teórie sme odvodili vzťah, umožňujúci z tejto závislosti vypočítať Michaelisovu konštantu.

Predpokladajme, že hydrolýza peptickej väzby prebieha podľa schémy



RR'	.	.	.	.	.	.	substrát (radikály spojené peptidickou väzbou)
P	.	.	.	.	.	.	pepsín
PRR'	.	.	.	.	.	.	komplex enzým—substrát.

Podľa Michaelisa a Mentenovej platí

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{([P] - [PRR']) [RR']}{[PRR']} = K_M$$

Rýchlosť hydrolýzy je ovládaná najpomalším dejom, teda

$$v = k_3 [PRR'] = k_3 \frac{[P] \cdot [RR']}{K_M + [RR']}$$

Keď znížime koncentráciu séra v zmesi a — krát, zníži sa v tomto pomere tak koncentrácia enzýmu, ako aj substrátu a pre rýchlosť hydrolýzy dostaneme výraz

$$v' = \frac{1}{a} \cdot k_3 \frac{[P] \cdot [RR']}{a \cdot K_M + [RR']}$$

Pomer tejto rýchlosti k pôvodnej označíme c :

$$c = \frac{v'}{v} = \frac{1}{a} \cdot \frac{K_M + [RR']}{a \cdot K_M + [RR']}$$

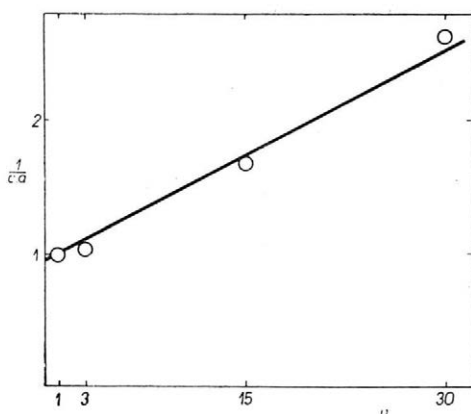
a po konečnej úprave mále lineárnu závislosť

$$\frac{1}{c \cdot a} = K_1 + K_2 \cdot a$$

$$\text{ kde } K_1 = \frac{[RR']/K_M}{[RR']/K_M + 1}, \quad K_2 = \frac{1}{[RR']/K_M + 1}$$

Keď vynášame do grafu závislosť $1/ca$ na a , zo smernice K_2 získanej priamky môžeme vypočítať K_M , ak poznáme východziu koncentráciu substrátu $[RR']$. Výpočet môžeme urobiť tiež na základe konštanty K_1 , jej presné zmeranie však bude asi obtiažne, pretože priamka musí prechádzať bodom o súradniciach (1,1) v blízkosti osi y .

Zatiaľ bol prevedený iba jeden experiment s cieľom určiť K pepsínu v sére navrhnutým spôsobom: vypočítali sme hodnotu 0,008 mol peptidických väzieb/liter, ktorú samozrejme považujeme za predbežnú. Získaná závislosť je na obr. 2a. Sérové bielkoviny sme považovali za jednotný substrát. V prípade, že K je rôzna pre albumín a jednotlivé globulíny, vypočítaná hodnota je priemerom, v ktorom sa odráža aj pomerný obsah týchto zložiek v sére. (V ďalšom bude potrebné previesť stanovenia s použitím značkovaneho gamma, resp. alfa- i beta-globulínu). Ak sa uvedená teória ukáže správnou, mohla by byť užitočná najmä v prípadoch ako je náš, že totiž enzým je v zmesi s nadbytkom svojho substrátu.



Obr. 2a. Určenie Michaelisovej konštanty systému pepsín-bielkoviny séra.

Závislosť $\frac{1}{c \cdot a}$ na a , ($c \dots$ pomer, v ktorom sa zníži rýchlosť proteolýzy pri a -násobnom znížení koncentrácie enzýmu i substrátu). Zmeraná smernica $K_2 = 0,0527$.

K vyhodnoteniu výsledkov polarografického stanovenia proteolytickej aktivity séra pri pH 1,5–1,7 previedla sa analýza 30 sér zdravých zvierat. Vypočítal sa priemer rozdielov výšky vlny inkubovanej a kontrolovanej vzorky a pri jednotlivých stanoveniach potom sa hodnotil index daný pomerom rozdielu výšok vln analyzovanej vzorky a priemeru. Normálne hodnoty indexu sú v rozmedzí 0,5–1,6.

U jednotlivých vzoriek séra sme sledovali závislosť aktivity pepsínu na dobe skladovania v chladničke. Zistili sme v zhode s J. Kolářom a spol. (6), že v priebehu týždňa sa aktivita prakticky nemení.

2. AKTIVITA PRI pH 3,7—3,9

Percento aktivity uvoľnené v priebehu inkubácie z väzby na bielkovinu je dané podľa vzorca

$$K = 100 \frac{N_i - N_k}{N_z - N_k}$$

Za predpokladu, že všetky molekuly v sére prítomné (včítane RISA) sú rovnako prístupné hydrolýze katepsínovým enzymatickým systémom, je percento celkovej bielkoviny rozloženej pri inkubácii totožné s hodnotou K. Keď označíme koncentráciu bielkovinného dusíka b [%], je množstvo dusíka uvoľneného autoproteolýzou do štepov rozpustných v 10% kyseline sulfoalicylovej za daných podmienok v 2 ml zmesi obsahujúcej 0,6 ml séra na 7,1 ml objemu určené výrazom

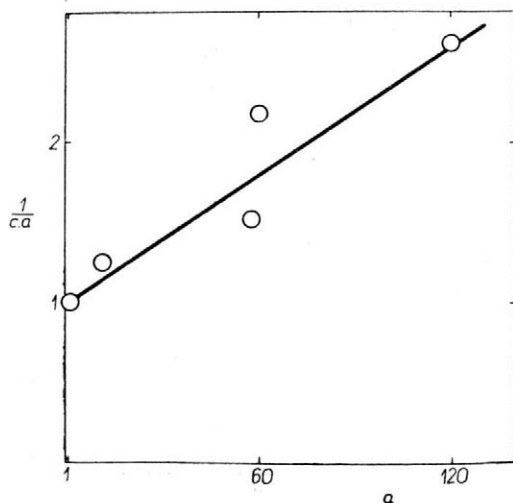
$$k = \frac{0,6}{100} \cdot \frac{2}{7,1} \cdot \frac{K}{100} = 1,69 \cdot 10^{-5} \cdot b \cdot K \text{ gramov.}$$

Chyba navrhutej metódy bola preskúšaná; pre hodnoty K, blízke normálnej úrovni, v hovädzom sére štandardná odchylka nepresahuje $\pm 10\%$. Ďalšia chyba, vznikajúca pri práci s RISA s rôznych výrobných šarží, sa dá odstrániť najlepšie tým, že určené hodnoty porovnáme s výsledkami získanými inou metódou. Pri stanovení normálnych hodnôt sme použili RISA z troch šarží.

Rýchlosť autoproteolýzy katepsínovým systémom sme zmerali u 26 kusov hovädzieho dobytká. Zistená priemerná hodnota činí $4,54 \pm 1,3\%$. Ak prijmeme predpoklady uvedené v časti 1. o zložení hovädzieho séra, je uvedená hodnota ekvivalentná 0,93 mEkv tyrozínu uvoľnených v zmesi obsahujúcej 1000 ml séra za 24 hodín pri 37°C . V literatúre sme nenašli údaje, s ktorými by bolo možné tento výsledok porovnať.

U katepsínu bola tiež sledovaná závislosť rýchlosti proteolýzy na znižovaní koncentrácie séra v inkubačnej zmesi. Závislosť $1/c \cdot a$ je na obr. 2b; hodnota K vypočítaná zo smernice získanej priamky je $5,75 \cdot 10^{-4}$ mol peptidických väzieb/l. Pre nedostačujúci počet experimentálnych údajov považujeme toto číslo za predbežné, plyní z neho však dôsledok, že na rozdiel od pepsínu — je K tak malá, že znižovanie obsahu séra v zmesi má malý vplyv na výslednú hodnotu K [%].

Obr. 2b. Stanovenie Michaelisovej konštanty systému katepsín-bielkoviny séra. Závislosť $\frac{1}{c \cdot a}$ na a pri stanovení proteolytickej aktivity katepsínu v hovädzom sére. Zmeraná smernica priamky: 0,0135 (c...pomer, v ktorom sa zníži rýchlosť proteolýzy pri a-násobnom znížení koncentrácie enzýmu i substrátu).



Keď napríklad do zmesi odmeriame miesto 0,6 ml len 0,05 ml, zistíme hodnotu K skoro nezmenenú. Tento fakt má veľký význam pre možnosť stanovenia proteolytickej aktivity v extrémne malých množstvách materiálu. (Zmeraná hodnota K je zrejme priemerom Michaelisových konštánt pre komplexy jednotlivých enzýmov katepsínového systému s jednotlivými zložkami séra, v ktorom sa odráža tiež relatívny obsah týchto enzýmov a zložiek séra).

Polarografické stanovenie sme previedli v sérach 30 zdravých kusov hovädzieho dobytká a vypočítali sme priemer rozdielu výšky vlny inkubovaného a neinkubovaného filtrátu. Pri hodnotení jednotlivých stanovení je potom smerodatný index, daný pomerom rozdielu výšky vlny analyzovanej vzorky a priemeru. Normálne hodnoty indexu boli v rozmedzí 0,6—1,65. U niektorých vzoriek séra sme sledovali závislosť katepsínovej aktivity na dobe skladovania v chladničke. Zistili sme, že v priebehu týždňa po odobraní krvi nedochádza k jej podstatným zmenám.

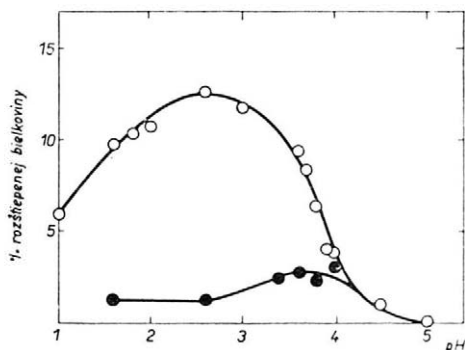
Kvôli overeniu prítomnosti katepsínu v hovädzom sére bola sledovaná závislosť rýchlosti proteolýzy na pH v rozmedzí 1 až 6 v sére zdravej 1½ročnej jalovice. V tom istom sére sme ďalej previedli inaktiváciu pepsínu nasledovným spôsobom: V časti séra, riedenej fyziologickým roztokom (1:1), sme upravili pH pomocou 0,5 n HCl na 3,5 a inkubovali 3 hodiny pri 37° C (premena pepsinogénu na pepsín). Potom sme pH upravili na 9,0 0,5 n hydroxidom sodným a nechali stáť 48 hodín pri laboratórnej teplote. V takto upravenom sére sme opäť zmerali proteolytickú aktivitu pri rôznych hodnotách pH.

V oboch prípadoch (upravené i neupravené sérum) boli koncentrácie séra 1,2 ml na 14,2 ml roztoku, obsahujúceho asi 1 μ c RISA. pH bolo upravené pomocou pufrů (do hodnoty 3,0 glycín — HCl, vyššie hodnoty Na₂HPO₄ — kyselina citrónová), a kyseliny soľnej, resp. hydroxidu sodného.

Závislosti sú znázornené na obr. 3. Vidieť, že značná časť aktivity pri pH 3,4 až 4,0 je spôsobená pepsínom (sledované sérum obsahovalo oproti normálnym hodnotám viac pepsínu). V prípade klinického využitia stanovenia katepsínu by bolo preto potrebné prevádzkať vždy súčasne tiež stanovenie pepsínu, aby sa dali výsledky správne posúdiť.

SŮHRN

Bola navrhnutá metodika pre stanovenie proteolytickej aktivity v hovädzom sére pri pH 1,5—1,7 a 3,7—3,9, založená na použití sérumalbumínu značeného rádiojódom, ktorá umožňuje súbežné alebo i samostatné polarografické vyhodnotenie výsledkov.



Obr. 3. Závislosť proteolytickej aktivity séra 1½ročnej jalovice na pH
 —○—○—... priebeh proteolytickej aktivity v normálnom sére
 —●—●—... priebeh proteolytickej aktivity v sére upravenom za účelom inaktivácie pepsínu

Boli takto stanovené hodnoty pepsínovej aktivity (pH 1,5—1,7) v 20 vzorkách hovädzieho séra. Získaná stredná hodnota je daná číslom $5,78 \pm 1,82$ % aktivity uvoľnenej z väzby na bielkovinu počas 24 hod. inkubácie pri 37°C v zmesi obsahujúcej 1,5 ml séra v 5,5 ml roztoku, čo zodpovedá približne 1,2 mEkv tyrozínu uvoľneného v zmesi obsahujúcej 1000 ml séra za uvedených podmienok.

Polarografickou analýzou sér 30 kusov hovädzieho dobytku bolo zistené, že normálna hodnota indexu [definovaný rovnako ako u J. Homolku (8)] je v rozmedzí 0,5—1,6.

V predbežnom pokuse bola určená Michaelisova konštanta pepsínu v hovädzom sére iným spôsobom než je známa metóda Lineweavera a Burka; zistená hodnota je 0,008 mol peptidických väzieb/liter.

Proteolytická aktivita pri pH 3,7—3,9 bola stanovená v 26 vzorkách hovädzieho séra. Vypočítaná stredná hodnota činí $4,54 \pm 1,3$ % aktivity uvoľnenej z väzby na bielkovinu pri inkubácii 24 hod. pri 37°C v zmesi obsahujúcej 0,6 ml séra v 7,1 ml roztoku, čo zodpovedá približne 0,93 mEkv tyrozínu uvoľneného v roztoku obsahujúcom 1000 ml séra za uvedených podmienok.

Na základe polarografickej analýzy sér 30 kusov hovädzieho dobytku bola stanovená normálna hodnota indexu [definovaného podľa Homolku (11)] v rozmedzí 0,6—1,65.

V predbežných pokusoch bola zmeraná tiež K systému katepsín—sérum postupom uvedeným v texte; zmeraná približne hodnota je $5,75 \cdot 10^{-4}$ mol peptidických väzieb/liter.

Bola tiež sledovaná závislosť proteolytickej aktivity krvného séra na pH v rozmedzí 1—6 v normálnom sére a v sére upravenom za účelom inaktivácie pepsínu. Zistilo sa, že značná časť aktivity pri pH 3,7—3,9 môže byť spôsobená účinkom pepsínu.

Došlo dňa 27. 4. 1965

Literatúra

1. Shulman N. R., Tagnon H. J.: J. Biol. Chem. 186, 69, 1950. — 2. Piper D. W.: Gastroenterology, 38, 616, 1960. — 3. Floch, M. H. a spol.: A. J. Clin. Pathol., 37, 350, 1962. — 4. Anson M. L.: J. Gen. Physiol., 22, 79, 1938. — 5. Mirsky a spol.: J. Lab. Clin. Med., 40, 17, 1952. — 6. Kolář J. a spol.: Čs. gastroenterologie, 18, 215, 1964. — 7. Janoušek St. a spol.: Čas. lék. českých, 94, 83, 1955. — 8. Homolka J.: Čas. lék. českých, 102, 1238, 1963. — 9. Janoušek St.: Čas. lék. českých, 98, 206, 1959. — 10. Homolka J., Soušek O.: Čas. lék. českých, 101, 234, 1962. — 11. Homolka J.: Čas. lék. českých 102, 1304, 1963.

Определение протеолитической активности кровяной сыворотки при помощи радиоактивного субстрата I.

Была предложена методика для определения протеолитической активности в говяжьей сыворотке pH 1,5—1,7 и 3,7—3,9, основанная на применении сыворотки-альбумина, меченого радиойодом, которая дает возможность параллельно или отдельно полярографически обработать результаты.

Таким образом были определены величины пепсиновой активности (pH 1,5—1,7) в 20 образцах говяжьей сыворотки. Полученная средняя величина дана числом $5,78 \pm 1,82$ % активности, освобожденной из связи белков в течение 24 часов инкубирования при 37°C в смеси, содержащей 1,5 мл сыворотки в 5,5 мл раствора, что соответствует приблизительно 1,2 mEkv тирозина в смеси, содержащей 1000 мл сыворотки в приведенных условиях.

Путем полярографического анализа сывороток 30 голов крупного рогатого скота было установлено, что нормальная величина индекса (тождествен определению И. Гомолки [8]) находится в пределах 0,5—1,6.

В предварительном опыте определялась константа пепсина по Михаелису в говяжьей сыворотке по другому способу, чем известный метод Линевевера и Бурка; полученная величина составляет 0,008 мол пептидических связей/литр.

Протеолитическая активность при pH 3,7—3,9 определялась в 26 образцах говяжьей сыворотки. Вычисленная средняя величина составляет 4,54—1,3 % активности, освобожденной из связи белков, при инкубировании в течение 24 часов при 37° С в смеси, содержащей 0,6 мл сыворотки в 7,1 мл раствора, что соответствует приблизительно 0,93 мЕкв тирозина, освобожденного в растворе, содержащем 1000 мл сыворотки в приведенных условиях.

На основе полярографического анализа сыворотки 30 голов крупного рогатого скота была установлена нормальная величина индекса (определенная по Гомолке [11]) в пределах 0,6—1,65.

В предварительных опытах также измерялась K_m системы катепсин-сыворотка приведенным в тексте способом; измеренная приблизительная величина составляет $5,75 \cdot 10^{-4}$ мол пептидических связей/литр.

Также изучалась зависимость протеолитической активности кровяной сыворотки на pH в пределах 1—6 в нормальной сыворотке и в сыворотке, приспособленной с целью инактивации пепсина. Оказалось, что значительная часть активности при pH 3,7—3,9 может быть вызвана действием пепсина.

Determining Proteolytic Activity of Blood Serum by means of Radioactive Substrate I.

A technique for determining proteolytic activity in bovine serum at pH 1,5—1,7 and 3,7—3,9 was proposed, based on the using of serum albumine marked by means of radio-iodine; this method makes simultaneous or independent polarographical evaluation of results possible.

Thus values of pepsine activity were determined (pH 1,5—1,7) in 20 samples of bovine serum. The mean value obtained is settled by the figure $5,78 \pm 1,82$ % of activity released from the protein binding during 24 hours' incubation at 37° C in a mixture containing 1,5 ml of serum in 5,5 ml of solution, which corresponds approximately to 1,2 мЕкв of tyrosine released in a mixture containing 1000 ml of serum under the mentioned conditions.

Polarographical analysis of sera of 30 heads of cattle proved that the normal index value [defined in the same ways as with J. Homolka (8)] is within the limits of 0,5—1,6.

Michaelis' constant of pepsine in bovine serum was determined in a preliminary experiment in another way than the well-known Lineweaver's and Burke's method is; the obtained value comes up to 0,008 мол of peptic bindings/litre.

Proteolytic activity at pH 3,7—3,9 was determined in 26 samples of bovine serum. The calculated mean value is $4,54 \pm 1,3$ % of activity released from protein-binding during 24 hours incubation at 37° C in a mixture containing 0,6 ml of serum in 1,7 ml of solution, which corresponds approximately to 0,93 мЕкв of tyrosine released in a solution containing 1000 ml of serum under the mentioned conditions. By means of polarographical analysis of sera of 30 heads of cattle normal index value [defined after Homolka (11)] was determined within the limits of 0,6—1,65.

K_m of the system cathepsin-serum was determined, too, in preliminary experiments using the procedure stated in the article; the approximate value measured is $5,75 \cdot 10^{-4}$ мол of peptic bindings/litre.

Dependence of proteolytic activity of blood sera on pH within the limits of 1—6 was also traced in normal serum and in serum treated in order to inactivate pepsine. It was found that a considerable part of activity at pH 3,7—3,9 may be caused by the influence of pepsine.

Prof. MVDr. Michal Bartík
inž. Ján Mešter

Vysoká škola poľnohospodárska,
veterinárska fakulta, katedra chémie
a fyziky, Košice, Komenského 71

Radioaktivní znečištění atmosféry způsobené pokusy s nukleárními zbraněmi, vyvolalo potřebu sledovat úroveň umělé radioaktivity životního prostředí nejen člověka, ale též i hospodářských zvířat, jež jsou zdrojem potravin živočišného původu. Lze ji sledovat různými metodami: zachycováním radioaktivních aerosolů na membránových ultrafiltrech, měřením aktivity atmosférických srážek, atd. Tyto metody nás informují jen o množství radioaktivních látek v ovzduší nebo o množství radioaktivních látek, které dopadly na určitou plochu zemského povrchu v určité době. Jaký však je stupeň kontaminace travních porostů, hlavního zdroje krmení pro hospodářská zvířata, těmito metodami nezjistíme.

Na kontaminaci travních porostů se zúčastňují všechny produkty jaderného štěpení, vznikající při výbuchu atomové pumy; biologicky jsou z nich nejnebezpečnější radiojod I^{131} , radiostroncium Sr^{90} , Sr^{89} a radiocesium Cs^{137} . Všechny tyto umělé radioaktivní izotopy přicházejí s krmivem do těl hospodářských zvířat, v nichž se ukládají zčásti do určitých orgánů a tkání a zčásti vylučují trusem, močí a mlékem.

Při radioaktivní kontaminaci travních porostů můžeme určovat jednak celkovou beta aktivitu, jednak sledovat hodnoty radionuklidů. Celkovou beta aktivitu určujeme obyčejně k vyjádření vztahu s aktivitou atmosférických srážek.

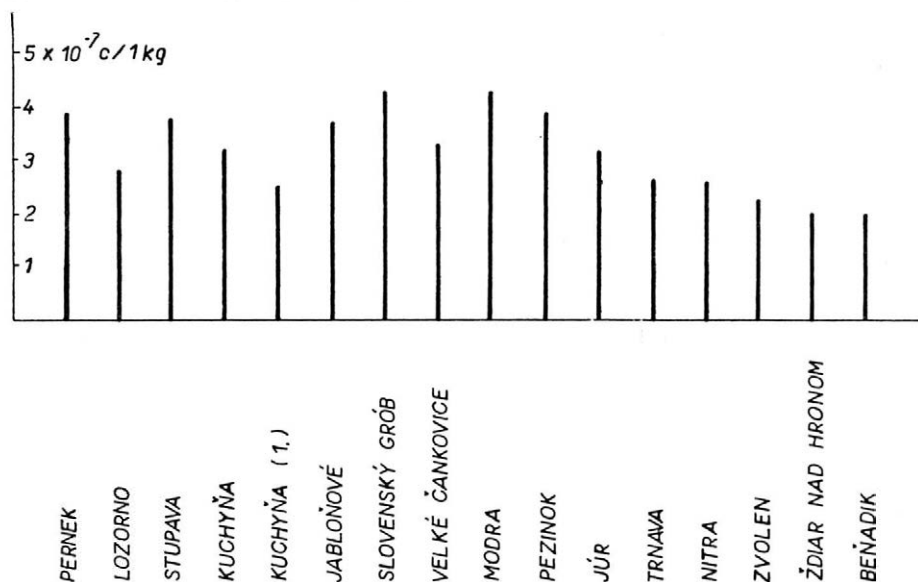
METODIKA ZPRACOVÁNÍ A MĚŘENÍ VZORKŮ

Vzorky byly odebírány z čerstvých travin, v některých případech též ze sena. Protože mezi odebranými vzorky byly traviny někdy suché, byly všechny vzorky nejprve usušeny, naváženy do spalovacích kelímků a spáleny při teplotě do 600°C . Získaný popel byl přenesen na hliníkovou měřicí misku o $\varnothing$ 26 mm v množství 300 mg a měřen na radioaktivitu beta na nukleárním čítači ACEC DM 160 ve spojení s universálním automatickým měničem vzorků PAU 50 s použitím GM trubice 30/30 AB Tesla Přemyslení o hmotě okénka $1-2\text{ mg/cm}^2$. GM trubice byla umístěna v olověném ochranném krytu o síle stěny 50 mm olova. Vzdálenost měřeného vzorku od okénka trubice byla 5 mm; u každého vzorku bylo měřeno 1000 impulsů. Při měření bylo použito standardu, připraveného z chloridu draselného, po předcházejícím vysušení a jemném rozetření. Stejný standard doporučuje Komise MGR (Mezinárodního geofyzikálního roku) pro měření dlouhodobých umělých radioaktivních izotopů, obsažených v radioaktivním spadu (3).

SLEDOVÁNÍ RADIOAKTIVNÍ KONTAMINACE TRAVNÍCH POROSTŮ

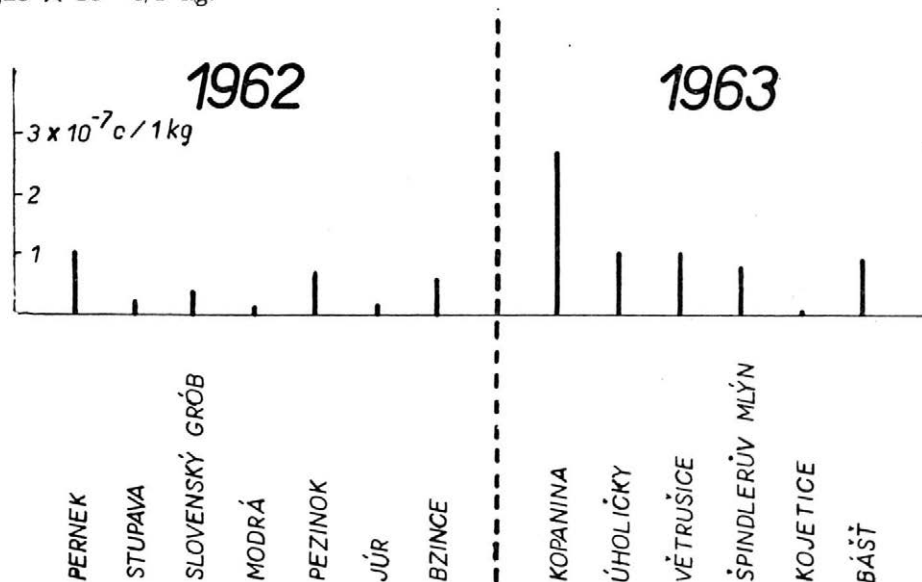
I. ETAPA: ZÁPADNÍ OBLAST ZÁPADOSLOVENSKÉHO KRAJE

V listopadu a v prosinci 1962 byla v této oblasti sledována radioaktivní kontaminace jednak travních porostů v té době dosud nepokosených, jednak u uskladněného sena ze sklizně 1962.



Graf 1.

Sledujeme-li hodnoty zjištěných aktivit na gr. 1, vidíme, že nejvyšší hodnoty se vyskytly v oblasti jižní části Bílých Karpat, kde jejich průměrná hodnota byla $3,55 \times 10^{-7} \text{ c/l kg}$, kdežto ve střední části tohoto kraje byl průměr $2,25 \times 10^{-7} \text{ c/l kg}$.

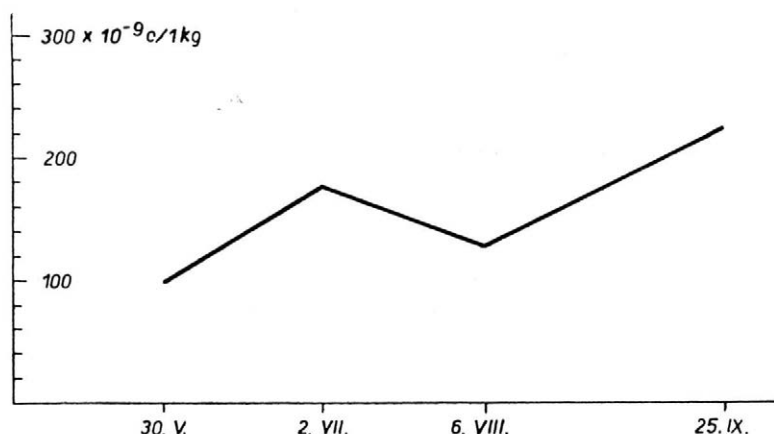


Graf 2. Kontaminace sena ze sklizně 1962 a 1963

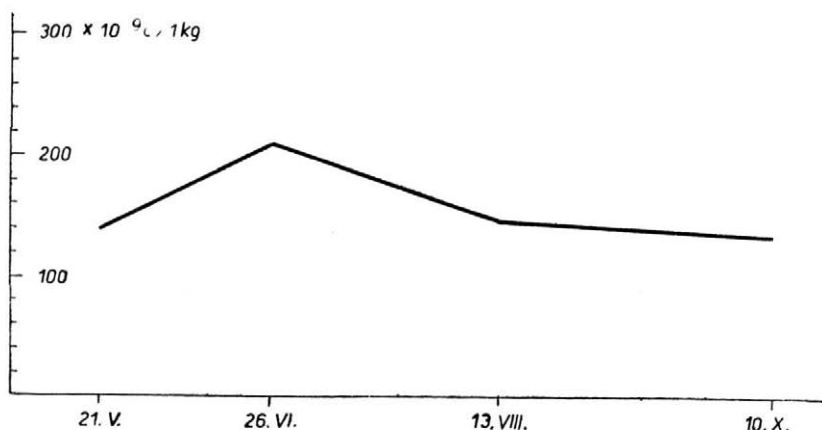
Při vyhodnocení aktivit sen (gr. 2) vidíme, že se setkáváme s hodnotami mnohem nižšími, s průměrem $0,4 \times 10^{-7}$ c/l kg. Vykazují tedy čerstvé traviny mnohem vyšší kontaminaci než traviny sušené, jež jsou zkrmovány v zimním období. Naše pozorování jsou shodná s pozorováními, která učinil K n o o p a M e r t e n (2) při sledování přítomnosti obsahu radiostroncía v seně. Tito autoři dále zjistili, že v letním období, kdy jsou dojnice krmeny čerstvými travinami, je obsah stroncia v mléce vyšší než v údobí, kdy je zkrmováno seno spolu s jinými krmivy.

II. ETAPA: PASTVINY V SEVERNÍCH A ZÁPADNÍCH ČECHÁCH

V této etapě byla sledována radioaktivní kontaminace na pastvinách v západních a severních Čechách v pastevním období 1963, tedy od května do října. V západních Čechách šlo o pastviny v prostoru Srní—Železná Ruda a v severních Čechách o pastviny severně od Liberce.



Graf 3.



Graf 4.

I. Hodnoty měsíčního spadu v záp. Čechách v r. 1963. (Fys. ústav, lékařské fakulty KU, Plzeň)

Měsíc	Místa odběru		
	Plzeň mc/1 km ²	Hradiště mc/1 km ²	Bavoryně mc/1 km ²
Leden	28,63	9,97	25,45
Únor	14,35	5,74	22,17
Březen	55,87	11,46	11,18
Duben	43,87	4,51	22,45
Květen	109,99	29,23	4,30
Červen	120,76	24,94	24,11
Červenec	90,38	26,08	95,50
Srpen	35,32	5,92	4,35
Září	34,94	14,61	2,04
Říjen	10,82	12,80	5,79
Listopad	16,58	12,92	1,48
Prosinec	7,58	0,75	7,43

Na grafu 3 je zachycen průběh hodnot radioaktivní kontaminace na šumavských pastvinách; sledujeme-li křivku průměrné hodnoty, vidíme, že koncem června a začátkem července bylo dosaženo maxima vzestupu, odpovídajícímu jarnímu maximu. V dalších měsících hodnota klesá, v září opět stoupá a počátkem října dosahuje opět vysoké hodnoty.

V grafu 4 je zachycen průběh hodnot radioaktivní kontaminace na pastvinách v okolí Liberce; zde se setkáváme opět s obdobným počátečním průběhem: v červenci se dosahuje maxima, potom je pokles vystřídán jen mírným vzestupem. Srovnáme-li křivky průměrných hodnot, vidíme, že červencový vzestup a srpnový pokles byl stejný, zatím co rozdíl je jen v konečných hodnotách; na šumavských pastvinách byla ke konci zaznamenána nejvyšší průměrná hodnota, kdežto na libereckých pastvinách byl vzestup jen nepatrný.

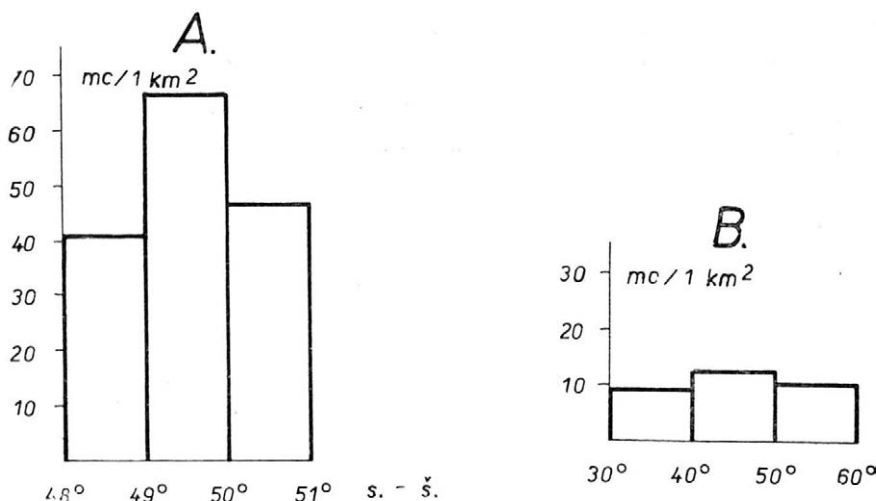
V tabulce I jsou uvedeny hodnoty radioaktivního spadu zaznamenaného v západních Čechách ústavem fyziky lékařské fakulty v Plzni na třech místech. Srovnáváme-li tyto hodnoty, vidíme, že se setkáváme s obdobným průběhem vzestupu, dosažením jarního maxima i poklesu hodnot, který jsme zaznamenali při sledování kontaminace pastvin v západních Čechách, kdy absolutní hodnoty zamoření byly mnohem větší než hodnoty měsíčního spadu v této oblasti.

III. ETAPA: SLEDOVÁNÍ HODNOT KONTAMINACE TRAVIN NA RŮZNÝCH MÍSTECH ČSSR

V této etapě byla sledována kontaminace travních porostů na různých místech ČSSR, počínaje nejzápadnějšími a konče nejvýchodnějšími v údobí od 23. září do 8. října 1963.

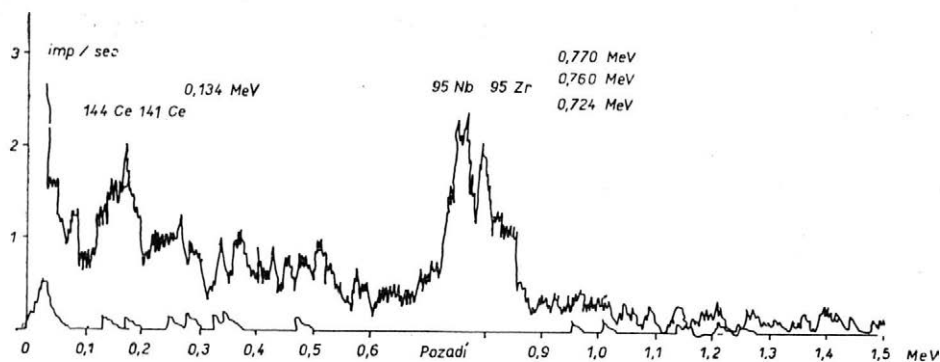
Jestliže zařadíme jednotlivé hodnoty míst do tří skupin podle zeměpisné šíře, setkáváme se s těmito průměry hodnot:

1. oblast zeměpisné šíře mezi 48—49°: 103×10^{-9} c/kg neb 41,2 mc/1 km²
2. oblast zeměpisné šíře mezi 49—50°: 165×10^{-9} c/kg neb 66,0 mc/1 km²
3. oblast zeměpisné šíře mezi 50—51°: 117×10^{-9} c/kg neb 46,8 mc/1 km²



Graf 5.

V části A jsou námi získané hodnoty. V části B jsou hodnoty, které zaznamenal L. T. Alexander (1) při sledování kontaminace půdy stronciem Sr^{90} . Srovnáme-li obě části, setkáváme se v podstatě s relativně obdobným průběhem. Hodnoty části A jsou v souladu s teorií o zamoření severní polokoule troposférickým spadem v oblasti 50° s. z. š. působením tryskových větrů (jet-stream) (5).



Graf 6. Spektrogram vzorku travin z I. etapy — západní část Západoslovenského kraje, zpracovaný automatickým scintilačním gamma spektrometrem SGXA 2 ACEC

SOUHRN

Byla sledována radioaktivní kontaminace travních porostů na různých místech území ČSSR. První etapa byla zaměřena na kontaminaci travin na past-

vinách v západních a severních Čechách. Na těchto lokalitách bylo zjištěno jarní maximum obdobné zjištěním jiného pracoviště (4). Ve II. etapě při sledování kontaminace sena byly zjištěny podstatně nižší hodnoty. Ve III. etapě byly hodnoty zařazeny do tří skupin podle pásem severní zeměpisné šířky; průběh těchto hodnot odpovídá teorii o vzniku spadu (5) a má obdobnou tendenci jako průběh hodnot zjištěných při sledování kontaminace půdy Sr 90 L. T. Alexander (1).

Spektrometrickým vyhodnocením vzorku travin z I. etapy, byly zaznamenány vrcholy energií pro zirkonium Zr 95, niobium Nb 95 a cer Ce 141, 144.

Došlo dne 15. 4. 1965

Literatura

1. Alexander, L. T.: „Strontium-90 Distribution as Determined by the Analysis of Soils“, Statement, Senate Hearings, 5-8 May 1959. — 2. Knop, E., Merten, D.: Der Einfluß der Fütterung auf den Sr⁹⁰-Gehalt der Milch, 11, 1959, Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 4, 255-259. — 3. Matoušek, J., Mertl, F., Patočka, St.: Některé poznatky změřeni umělé radioaktivity vnějšího prostředí, Plzeň. lék. sborník 18, 1962, 57-63, Plzeň. lék. sborník 19, 1962, 43-53. — 4. Petrovič, P.: Vyhodnocení radioaktivity atmosféry na území ČSSR za rok 1963, Meteorologické zprávy, 17, 1964, 3, 88-92. — 5. Martell, E. A.: Artificial radioactivity from nuclear tests up to november 1958, GRD Research Notes No. 19.

Изучение радиоактивной контаминации травостоев на территории ЧССР

Изучались радиоактивная контаминация травостоев на разных местах территории ЧССР. Первый этап был направлен на контаминацию луговых трав на пастбищах в северной и западной Чехии. На этих местах и был установлен весенний максимум аналогично определениям другого рабочего пункта (4). На II этапе при изучении контаминации сенa были установлены значительно меньшие величины. На III этапе величины были разбиты на три группы по зонам северной географической широты, движение этих величин соответствует теории о возникновении радиоактивных выбросов (5) и имеет аналогичную тенденцию как ход величин, установленных при изучении контаминации почвы Sr 90 L. T. Александром (1).

Спектроскопической оценкой образцов луговых трав I этапа были обозначены культивационные точки энергии для циркония Zr 95, ниобия Nb 95 и цер Ce 141, 144.

Tracing Radioactive Contamination of Grassland on the Area of ČSSR

The radioactive contamination of grassland was traced in various places of ČSSR. The aim of the first stage was to obtain information about grass contamination on pastures in western and northern Bohemia. A spring maximum analogous to findings of another research place (4) was ascertained in these localities. At the second stage in tracing hay-contamination substantially lower values were ascertained. At the third stage the values were arranged in three groups according to zones of the north geographical latitude; the course of these values corresponds to the theory of the fall-out origin (5) and has a tendency analogous to the course of values of soil — contamination by Sr 90 found by L. T. Alexander (1).

In spectrometric evaluation of a grass-sample from the 1st stage the peaks of energies for zirconium Zr 95, niobium Nb 95 and cer Ce 141, 144 were recorded.

MVDr. Jan Pinkas

Inž. Jiří Pluhař

Ústřední státní veterinární ústav,
Praha 2, Na Kozačce 3

OBSAH

Otoupal P., Pawel O., Kalousová V.: K patoanatomickým nálezům u prasat ozářených celotělově gama paprsky	641
Otoupal P.: Histopatologické změny u prasat celotělově ozářených gama paprsky	647
Pospišil J., Beran M.: Dynamika změn počtu buněk obvodové krve u prasat a koz celotělově ozářených ⁶⁰ Co	657
Procházka Z.: Změny počtu bílých krvinek u kura domácího po účinku stoupající expozice paprsky X	663
Zícha B.: Vliv záření na aktivitu některých dehydrogenáz v jaterních homogenátech a mitochondriích krys	671
Zícha B., Beneš J.: Oxydační produkty nenasycených mastných kyselin v ozářeném organismu	681
Schanzel H., Synek O.: K inkorporaci P 32 do svalových larev <i>Trichinella spiralis</i>	691
Bartík M., Mešter J.: Stanovení proteolytické aktivity krvního séra pomocí radioaktivního substrátu. — I. Stanovení autoproteolytické aktivity hovädzieho sera v kyslej oblasti pH	695
Pinkas J., Pluhař J.: Sledování radioaktivní kontaminace travních porostů na území ČSSR	707

СОДЕРЖАНИЕ

Отоупал П., Павел О., Калосова В.: К вопросу патoанатoмических диагнозов у свиней, облученных по всему телу гамма-лучами (646). — Отоупал П.: Гистологические изменения у свиней, облученных по всему телу гамма-лучами (655). — Поспишил Я., Беран М.: Динамика изменения числа клеток периферической крови у свиней и коз, облученных ⁶⁰Co (661). — Прохазка З.: Изменение числа белых кровяных телец у кур после действия повышающегося облучения лучами X (669). — Зиха Б.: Влияние облучения на активность некоторых дегидрогеназ в печеночных гомогенатах и митохондриях крыс (679). — Зиха Б., Бенеш Я.: Окислительные продукты ненасыщенных жирных кислот в облученном организме (689). — Сханзел Г., Сынек О.: Поступление P 32 в личинки трихин *Trichinella spiralis* (694). — Бартик М., Мештер Я.: Определение протеолитической активности кровяной сыворотки при помощи радиоактивного субстрата I. (704). — Пинкас Я., Плугарж Я.: Изучение радиоактивной контаминации травостоев на территории ЧССР (712).

CONTENT

Otoupal P., Pawel O., Kalousová V.: On Patho-Anatomical Findings in Pigs Whole-Body Irradiated with Gamma-Rays (646). — Otoupal P.: Histopathological Changes in Pigs Whole-Body Irradiated with Gamma-Rays (655). — Pospišil J., Beran M.: Dynamics of the Number-Changes of Cells in Peripheral Blood in Pigs and Goats Whole-Body Irradiated with ⁶⁰C (661). — Procházka Z.: Changes of White Blood Cell Count in Domestic Fowl (*Gallus domesticus*) following the Influence of an Increasing Dose of X-Rays (669). — Zícha B.: Influence of Radiation on the Activity of some Dehydrogenases in Liver Homogenates and in Mitochondriae of Rats (679). — Zícha B., Beneš J.: Oxidation-Products of Unsaturated Fatty Acids in an Irradiated Organism (689). — Schanzel H., Synek O.: The on Incorporation of P 32 into Muscle-Stage Larvae of *Trichinella spiralis* (694). — Bartík M., Mešter J.: Determining proteolytic Activity of Bloom Serum by means of Radioactive Substrate I. (704). — Pinkas J., Pluhař J.: Tracing Radioactive Contamination of Grassland on the Area of ČSSR (712).

INHALT

Otoupal P., Pawel O., Kalousová V.: Beitrag zu pathologisch-anatomischen Befunden bei den mit Gammastrahlen behandelten Schweinen (646). — Otoupal P.: Histopathologische Veränderungen bei den auf dem ganzen Körper mit Gammastrahlen behandelten Schweinen (656). — Pospíšil J., Beran M.: Die Dynamik der Zellzahlen im peripheren Blut mit ^{60}Co ganzkörperbestrahlter Schweine und Ziegen (661). — Procházka Z.: Änderungen der Leukozytenzahl beim Haushuhn nach der Einwirkung von steigender Exposition der X-Strahlen (669). — Zícha B.: Einfluß der Strahlung auf die Aktivität einiger Dehydrogenasen in den Leber-Homogenaten und Mitochondrien der Ratten (679). — Zícha B., Beneš J.: Die Oxydationsprodukte ungesättigter Fettsäuren im bestrahlten Organismus (689). — Schanzel H., Synek O.: Zur Inkorporation von P 32 in Muskellarven von *Trichinella spiralis* (694). — Bartík M., Mešter J.: Bestimmung der proteolytischen Aktivität des Bluteserums mit Hilfe eines radioaktiven Substrats I. (res. E/704). — Pinkas J., Pluhař J.: Die Verfolgung der radioaktiven Verseuchung der Grasbestände auf dem Gebiet der ČSSR (712).

TABLE DES MATIÈRES

Otoupal P., Pawel O., Kalousová V.: Constatations pathologico-anatomiques chez les porcs irradiés sur tout leur corps par les rayons gamma (res. An/646, Al/646). — Otoupal P.: Modifications histopathologiques chez les porcs irradiés par les rayons gamma (res. An/655, Al/656). — Pospíšil J., Beran M.: Dynamique des modifications du nombre des globules blancs du sang périphérique chez les porcs et les chèvres, irradiés sur tout leur corps par ^{60}Co (res. An/661, Al/661). — Procházka Z.: Modifications du nombre des globules blancs chez les galinacés domestiques, dues à l'exposition progressive aux rayons X (res. An/669, Al/669). — Zícha B.: Influence de l'irradiation sur l'activité de certaines déhydrogénases dans les produits de homogénéisation de foie et dans les mitochondries des rats (res. An/679, Al/679). — Zícha B., Beneš J.: Produits d'oxydation des acides gras non saturés dans l'organisme irradié (res. An/689, Al/689). — Schanzel H., Synek O.: Incorporation de P 32 dans les larves musculaires de *Trichinella spiralis* (res. An/694, Al/694). — Bartík M., Mešter J.: Détermination de l'activité protéolytique du sérum sanguin au moyen du substrat radioactif I. Détermination de l'activité autoprotéolytique du sérum bovin dans la zone acide de pH (res. An/704). — Pinkas J., Pluhař J.: Etude de la contamination radioactive des cultures herbées sur le territoire de la Tchécoslovaquie (res. An/712, Al/712).